

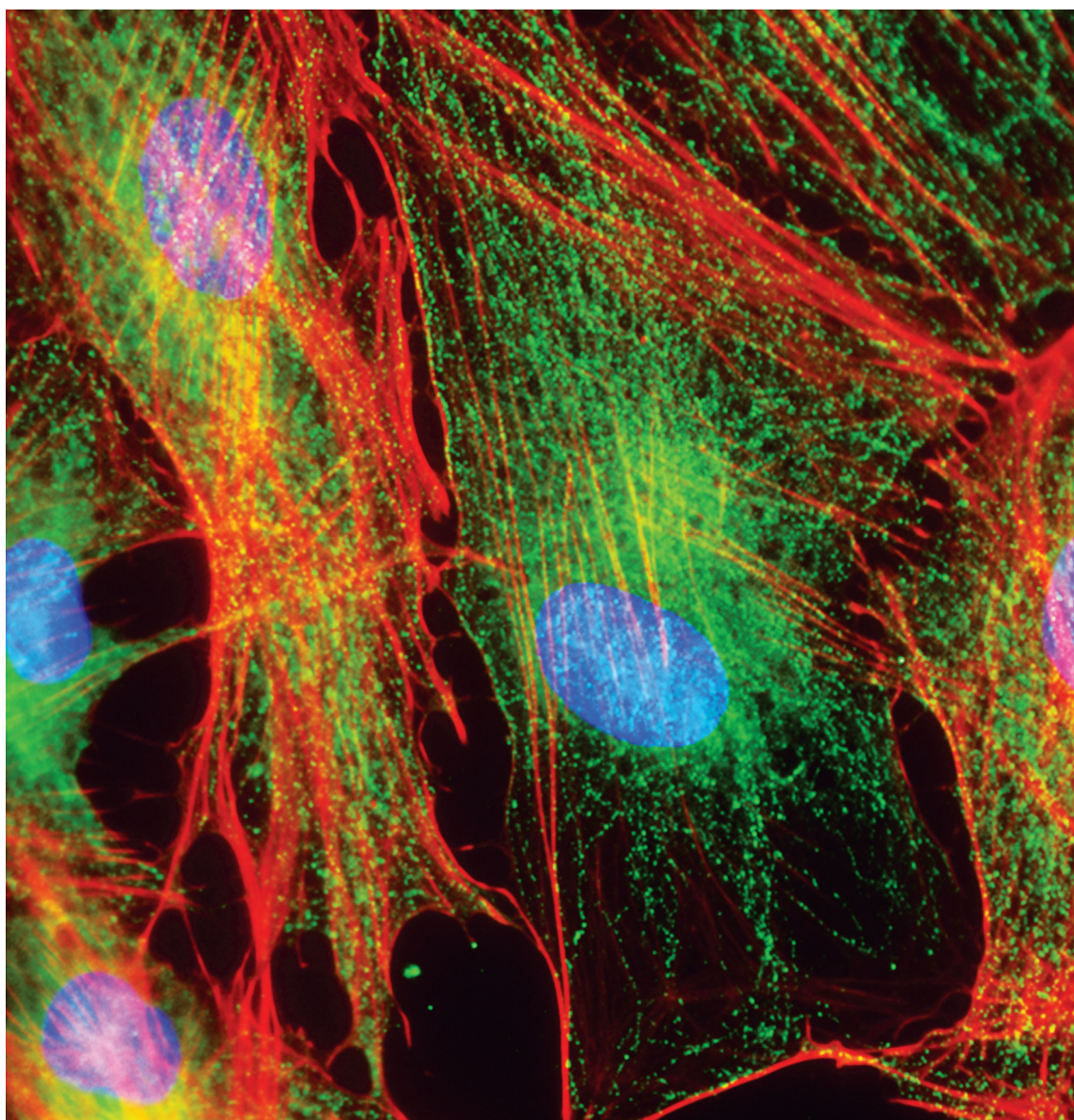
ISSN 2313-1829

Том XII, № 3, 2017

# Гены & Клетки

---

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**МАТЕРИАЛЫ III НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА  
ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ  
Москва, 15–18 ноября 2017 года**

[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)

---

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

---

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

# Genes & Cells

---

Vol. XII, № 3, 2017

© Human stem cells institute, 2017

---

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

**МАТЕРИАЛЫ  
III НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА  
ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ  
МЕДИЦИНЕ**

Москва  
15–18 ноября 2017 года



**Фото на обложке:**

«Экспрессия тяжелых цепей миозина при кардиогенной дифференцировке стволовых клеток сердца крысы»

**Автор:** к.м.н. К.В. Дергилёв,  
ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР КАРДИОЛОГИИ» Минздрава России

**Техническая подготовка материалов и тезисов:**

Александрюшкина Н.А., Еремичев Р.Ю., Кузнецова Е.С., к.м.н. Макаревич П.И., Слободкина Е.А.,  
к.э.н. Тарасова Е.В., Шаталова Н.Н.

*Корректурa Квашниной Н.В.*

*Компьютерная верстка и макет: Гавриловой С.В.*

При публикации Издатель и Оргкомитет Конгресса сохраняли авторскую орфографию и пунктуацию в тексте тезиса. Издатель и Оргкомитет Конгресса не несут ответственности за предоставленные авторами формулировки в разделе «Финансирование исследования» при их несоответствии требованиям финансирующих организаций. Названия организаций и научных институтов могли быть изменены в соответствии с официальной контактной информацией организаций на момент публикации тезисов.

# МАТЕРИАЛЫ III НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Москва, 15–18 ноября 2017 г.

## ЛЕКЦИИ ОТКРЫТИЯ

### **Парфёнова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
yeparfyon@mail.ru

### **ПЕРСПЕКТИВЫ РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА: STATE OF ART**

Сердечно-сосудистые заболевания на протяжении нескольких десятилетий лидируют в списке причин смертности населения в мире, опережая значительно все другие болезни, включая онкологические. Одной из важнейших проблем в области сердечно-сосудистых заболеваний является сердечная недостаточность, увеличение частоты которой в последние годы приобретает характер эпидемии. В значительной степени это обусловлено отсутствием в арсенале современной медицины средств, позволяющих восстанавливать необратимо утраченный при инфаркте и других заболеваниях миокард. Фундаментальные исследования последних десятилетий позволили изменить существовавшую почти 100 лет концепцию, рассматривающую сердце в качестве постмитотического органа, неспособного к регенерации. Показано, что сердце способно к постоянному обновлению и регенерации после повреждения, хотя и крайне ограниченной. Представления о механизмах обновления клеток сердца в течение жизни и его частичной регенерации при повреждении претерпели значительные изменения за последние 20 лет. В докладе будут рассмотрены механизмы участия стволовых и прогениторных клеток сердца в его обновлении и регенерации, роль пролиферации ограниченного пула кардиомиоцитов в этих процессах, а также современные подходы к восстановлению утраченного миокарда с помощью трансплантации стволовых клеток, стимуляции эндогенного регенеративного резерва, трансплантации кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток, и перспективы прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-15-00181.*

### **Томилин А.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
a.tomilin@incras.ru

### **ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ**

Плюрипотентные стволовые клетки выдвинулись на передний край клеточной биологии и, возможно, всей биомедицины в связи с широчайшими возможностями применения этих клеток для моделирования заболеваний и тканезаместительной терапии у человека. Уникальной особенностью этих клеток является способность к самоподдержанию и дифференцировке во все клеточные типы тканей взрослого организма (за исключением двух внезародышевых клеточных типов — трофэктодермы и первичной эндодермы). В докладе будет освещена история развития данного направления биологии, приведены результаты современных достижений в области плюрипотентных стволовых клеток. Заметная доля этих исследований посвящена центральному регулятору клеточной плюрипотентности, РОУ-домениному белку Oct4, необходимому как для поддержания, так и для индукции клеточной плюрипотентности. В докладе будет затронута важная тема, касающаяся приложения фундаментальных знаний о плюрипотентных стволовых клетках в практической медицине.

Финансирование исследования: *Проекты, представленные в докладе, были поддержаны грантами РФФИ № 14-50-00068 и 17-14-01407.*

## ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

### **Chekhonin V.P.<sup>1</sup>, Zhang C.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *The Pirogov Russian National Research Medical University*

<sup>2</sup> *Tianjin Medical University Cancer Hospital & Institute*  
chaozhang2015@gmail.com

#### **STEM CELLS TRANSPLANTATION ON TREATING CHRONIC SPINAL CORD INJURY**

Spinal cord injury (SCI) is a severe trauma of the central nervous system (CNS) that frequently results in irreversible loss of sensory and motor functions. These injuries mainly present as a complete loss of sensory-motor function below the location of injury as well as incontinence, with worldwide characteristics of high incidence, high morbidity, high cost and early onset. Each year, an average of 15 to 40 people out of every one million has a spinal cord injury worldwide.

The purpose: To study the effect of Stem Cells (SC) transplantation for the PTS management and functional improvement post chronic SCI.

Methods and approaches: 1. The development of the rat model on chronic SCI 2. The evaluation of chronic SCI with Diffusion Tensor Imaging (DTI) and Diffusion Tensor Tracking (DTT) 3. Precise delivery into chronic SCI syringomyelic cysts with magnetic nanoparticles MRI visualization 4. The syringomyelia management and functional improvement post chronic spinal cord injury with varying numbers of SC Results and Conclusions: I. The chronic SCI rat modelling was successfully developed. The chronic SCI rat modelling gradually formatted on the 4 week post injury. Three types of syringomyelic cysts were observed in the present study: Three main classes were observed: 5 rats showed the sign of class 1 (50%), with the appearance of single cyst in the lesion site; 3 rats showed the sign of class 2 (30%), with the appearance of 2 separated cysts with similar size in the lesion site; and 2 rats showed the sign of class 3 (20%), with the appearance of several small cysts in the lesion site. II. Diffusion Tensor Tracking (DTT) may have significant advantages in assessing the injured spinal cord. Both FA and ADC are good indicators for quantitatively evaluating the SCI. III. A strategy of precise delivery into chronic SCI syringomyelic cysts was developed. This strategy may aid in developing a new method for studying chronic SCI and a novel treatment for syringomyelic cysts. IV. MSCs transplantation is beneficial for functional recovery in chronic SCI rats. MSCs transplantation is able to decrease the formatted PTS post chronic SCI. MSCs' effects showed the number-dependent manner, the  $1 \times 10^6$  cells are suggested in that presentation. DTT and DTI are reliable approach for evaluating neuronal fibers regeneration in chronic SCI rats.

### **Li K.<sup>1</sup>, Truong A.V.<sup>1</sup>, Chang Y.<sup>2</sup>, Hu Y**

<sup>1</sup> *National Tsing Hua University*

<sup>2</sup> *Chang Gung Memorial Hospital*  
ychu@mx.nthu.edu.tw

#### **USING BACULOVIRUS-MEDIATED MIR-214 SPONGES SWITCH OSTEOPOROTIC ASCS FROM ADIPOGENESIS TO OSTEOGENESIS FOR OSTEOPOROTIC BONE DEFECTS REPAIR**

Clinically, an imbalance between adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells (MSCs) is observed in osteoporotic patients. Recently, many studies revealed aberrant MicroRNAs (miRNAs) expression in elderly osteoporotic patients, but the role of miRNAs between adipogenesis and osteogenesis draws much less attention. Here we attempted to switch osteoporotic adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) from adipogenesis to osteogenesis for repairing osteoporotic bone defects through miRNAs regulation. We found that ASCs harvested from rats with long-term estrogen deficiencies exhibited over-expression of miR-214. Transduction of the osteoporotic ASCs with the baculovirus (BV) that exploited Cre/LoxP-mediated recombination for prolonged expression of miR-214 sponges persistently down-regulated the miR-214 expression. The miR-214 suppression switched the osteoporotic ASCs differentiation from adipogenesis to osteogenesis through Wnt signaling, as well as promoted the osteoporotic BMSCs osteogenesis via BMP7 in a paracrine fashion. To augment the in vivo bone healing, we co-transduced the osteoporotic ASCs with the hybrid BV expressing miR-214 sponge and another BV expressing BMP2. Allotransplantation of the BMP2/miR-214 sponges-expressing osteoporotic ASCs into the critical-size defect (3 mm in diameter) at the femur metaphysis of ovariectomized rat potentiated the bone healing and remodeling, filling 22.4% of bone volume/total volume (BV/TV) at 5 weeks. The BMP2/miR-214 sponges-expressing osteoporotic ASCs not only accelerated the healing, but also ameliorated the bone quality (density, trabecular number, trabecular thickness and trabecular space), as evaluated by micro computed tomography, histology and immunohistochemical staining. Altogether, this study paved a new avenue to treatment of osteoporotic bone defects using miRNA-modulated ASCs.

### **Tarabykin V.**

*Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte*  
victor.tarabykin@charite.de

#### **DEFINING THE FATE OF NEOCORTICAL STEM CELLS: EXTRINSIC AND INTRINSIC FACTORS**

Cortical progenitors sequentially give rise to the different layers of the cortex. Neurons occupying the different layers show a high degree of heterogeneity with respect to their transcriptome, axonal targeting, dendritic complexity and physiology. Understanding how such a heterogeneous population of neurons is born from a smaller, relatively homogeneous population of progenitors has always invited great attention.

Previous work has shown that cortical progenitors undergo progressive fate restriction. This was proposed to be an intrinsic phenomenon. However, it is also well established that environmental cues influence cell fate decisions.

We showed that that cortical progenitors receive cues from postmitotic neurons through a feedback signal instructing a shift from neurogenesis to gliogenesis. We identified Sip1, a transcription repressor, as a master regulator of this feedback mechanism. Within postmitotic neurons it controls Fgf9 expression, which in turn regulates this shift. Such a feedback signaling also controls a shift from producing deep layer to upper layer neurons. We provide direct evidence that in the developing mouse neocortex, Ntf3, a Sip1 target neurotrophin, acts as a feedback signal between postmitotic neurons and progenitors, that controls cell fate switch. Furthermore, we identified cell intrinsic mechanisms that control of cell fate of neocortical progenitors.

#### **Widera D.**

*University of Reading*  
d.widera@reading.ac.uk

#### **SECRETOME OF ADULT HUMAN STEM CELLS AS A NOVEL APPROACH TO STIMULATE ENDOGENOUS REGENERATION**

Adult human stem cells including mesenchymal stem cells (MSCs) are clinically used adult stem cells that can improve clinical symptoms of a variety of diseases including neurodegenerative disorders, osteoporosis, diabetes and stroke. However, their regenerative potential seems not to be a result of integration and differentiation into affected cell types, but rather a consequence of reduction of inflammation, immunomodulation and improvement of endogenous regeneration. These bystander effects are known to be at least partly mediated by extracellular vesicles (EVs) secreted by adult stem cells. EVs are small vesicles that are released by all human cells, but their content and regenerative potential is highly dependent on the cell type and the physiological status. Recent developments provide clear evidence for a pivotal contribution of EVs to regeneration observed after transplantation of different adult stem cell types. In this talk, current knowledge on stem cell-derived EVs will be critically discussed. In addition, the potential of inflammatory licensing of stem cells prior to EV generation will be evaluated.

#### **Yepes M.**

*Department of Neurology and Center for Neurodegenerative Disease, Emory University School of Medicine and Veterans Affairs Medical Center*  
myepes@emory.edu

#### **THE PLASMINOGEN ACTIVATING SYSTEM AND NEUROLOGICAL REPAIR AFTER STROKE**

Our research focuses on the role of the plasminogen activating system in neurorepair. More specifically, we investigate the biological mechanisms whereby the release of plasminogen activators from neurons and astrocytes and their interaction with specific receptors promotes axonal and dendritic recovery in the ischemic brain. Our main goal is to use this information to design effective therapeutic strategies to promote

functional recovery in patients that have suffered an ischemic stroke.

#### *References:*

1. Merino P, Diaz A, Jeanneret V, Wu F, Torre E, Cheng L, Yepes M. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System. *J Biol Chem.* 2017 Feb 17;292(7):2741-2753.
2. Wu F, Catano M, Echeverry R, Torre E, Haile WB, An J, Chen C, Cheng L, Nicholson A, Tong FC, Park J, Yepes M. Urokinase-type plasminogen Activator Promotes Dendritic Spine Recovery and Improves Neurological Outcome Following an Ischemic Stroke. *J Neurosci.* 2014 Oct 22;34(43):14219-32.
3. Jeanneret V, Wu F, Merino P, Torre E, Diaz A, Cheng L, Yepes M. Tissue-Type Plasminogen Activator Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate. *Front Mol Neurosci.* 2016 Nov 9;9:121.
4. Jeanneret V, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of synaptic function in the central nervous system. *Neural Regen Res.* 2017 Mar;12(3):362-365.
5. Jeanneret V, Yepes M. The Plasminogen Activation System Promotes Dendritic Spine Recovery and Improvement in Neurological Function After an Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* 2016 Feb 4. [Epub ahead of print]
6. Yepes M. Tissue-Type Plasminogen Activator is a Neuroprotectant in the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci.* 2015 Aug 17;9:304.

#### **Александрова М.А.**

*ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН*  
mariaaleks@inbox.ru

#### **РОЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ**

Нейродегенеративные заболевания, обусловленные генетически или приобретенные в жизни, имеют драматические последствия, поскольку у млекопитающих и человека ткани ЦНС практически не восстанавливаются вследствие отсутствия репаративной регенерации. Парадоксально, но при этом у всех изученных видов позвоночных взрослая центральная нервная система сохраняет нейральные стволовые клетки (НСК), обеспечивающие локальный конститутивный нейрогенез, и покоящиеся (латентные) нейральные предшественники, которые могут быть активированы в ситуациях повреждения. Стволовые клетки мозга чрезвычайно интригующий феномен. За два последних десятилетия результаты исследований по биологии нейральных стволовых клеток внесли существенные коррективы в фундаментальные знания о процессах развития, регенерации и функционирования в ЦНС. На базе изучения клеточных и молекулярных механизмов дифференцировки и поведения НСК сформировались новые представления об участии стволовых клеток в процессах обучения и памяти. В направлении регенеративной медицины сложились фундаментальные понятия, из которых развились оригинальные терапевтические подходы к нейродегенеративным заболеваниям в мозгу человека. В их основе лежит особенный регенераторный потенциал НСК и клеток предшественников, который суммируется из их способности выделять многие биологически активные факторы, иммуномодуляции и возможности замещать погибшие клетки, отсутствующие в патологическом мозгу. Разработаны базовые методы получения и поддержания НСК в культуре и их дифференцировки в разные типы нейронов и глиальных клеток. Они позволили обнаружить в сетчатке глаза человека,

в пигментном эпителии латентные стволовые клетки способные к репрограммированию и развитию по нейральному пути *in vitro*, что интересно для заместительной клеточной терапии в соответствующих заболеваниях. Благодаря успехам технологий репрограммирования значительно расширился арсенал необходимых для регенеративной медицины типов клеток. В ближайшие годы предстоит оценить, какие регенераторные стратегии: активация латентных НСК; репрограммирование глии в нейроны *in vivo* или нейротрансплантация определенных видов стволовых клеток наиболее перспективны для клеточной терапии в ЦНС у человека.

Финансирование исследования: *госпрограмма*.

### **Буравкова Л.Б.**

*Институт медико-биологических проблем*  
buravkova@wolf.ru

### **СТАРЕНИЕ МСК: РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

Мультипотентные стромальные клетки (МСК) взрослого организма рассматриваются как ключевой интегративный компонент регенеративной системы, направленной на функциональное восстановление поврежденных органов. При этом актуальным является вопрос о возрастных изменениях популяции МСК. Экспериментальные данные расширяют представление о роли прогениторов, но не снимают ряд существующих противоречий. Например, функциональные изменения МСК при старении отражают влияние возраста на эпигеном и протеом (некоторые из этих изменений обратимы). С другой стороны, нет единого мнения о возрастных изменениях такого важного свойства прогениторных клеток, как дифференцировочный потенциал, что может быть связано с тканевым источником их получения, большой гетерогенностью МСК и методами их выделения и культивирования. Активное изучение паракрыных свойств МСК привело к заключению, что процесс клеточного старения сопровождается приобретением специфического секреторного фенотипа, который способен влиять на выживание, пролиферацию и дифференцировку близлежащих клеток. Помимо прочего, этот секретом может оказать еще и канцерогенное воздействие. В свете этих данных очень важным является участие провоспалительных медиаторов и процесс поляризации МСК при старении. Одним из наиболее удобных подходов к изучению клеточного старения *in vitro* остается длительное культивирование до наступления репликативного старения, когда пролиферативная активность снижается, достигая лимита Хейфлика. Необходимо учитывать также влияние факторов микроокружения (в т.ч. содержание кислорода), способных существенно изменять функциональное состояние клеток. Окислительный стресс может активировать процессы клеточного старения, поэтому часто используется как модель одного из так называемых «физиологических стрессов», приводящих к остановке деления или к апоптозу. Тем не менее, остается открытым вопрос о схожести механизмов репликативного и стресс-индуцируемого старения и их участия в физиологических процессах. Старение клеток сопровождается эпигенетическими изменениями и сдвигами в экспрессии генов, в том числе функционально связанными с возрастными процессами в организме. Репрессируется дифференциальная экспрессия

генов, отвечающих за интегративность генома и регуляцию транскрипции. Интересно, что в различных типах прогениторных клеток взрослого организма (например, МСК и ГСК) при старении изменяются различные паттерны генов, а транскриптомные изменения МСК при репликативном старении отражают возрастные сдвиги. Особую актуальность проблема приобретает в связи с выраженной тенденцией к увеличению продолжительности жизни в развитых странах, снижением регенеративных способностей с увеличением возраста и использованием аутологических клеток в регенеративной медицине. Очевидно, что процессы старения клеток при изменении факторов микроокружения (внеклеточный матрикс, межклеточные контакты, паракрыные факторы, содержание кислорода и др.) необходимо учитывать при разработке новых клеточных технологий.

### **Васильев А.В.<sup>1</sup>, Петракова О.С.<sup>2</sup>, Борисов М.А.<sup>2</sup>, Роговая О.С.<sup>1</sup>, Гвазава И.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России  
113162@bk.ru

### **ФЕНОМЕН ПЛАСТИЧНОСТИ В ПОЛУЧЕНИИ ИНСУЛИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИНСУЛИН-ЗАВИСИМОГО ДИАБЕТА**

Определение границ пластичности различных типов клеток является одной из актуальных задач современной науки. Проведенный анализ экспрессии генов культуры протоковых клеток поднижнечелюстной слюнной железы мыши выявил значительную фенотипическую конвергенцию данных клеток с клетками энтодермы, что позволяет предположить, что поднижнечелюстные слюнные железы могут быть использованы как источник клеток для заместительной клеточной терапии органов энтодермального происхождения. Целью данной работы являлось исследование пластичности клеток поднижнечелюстных слюнных желез (КСЖ) мыши и человека. В результате были разработаны методики культивирования и дифференцировки данных клеток, которые в дальнейшем были исследованы с помощью методов проточной цитометрии, иммуноцитохимии, а также иммуноферментного анализа и ПЦР-РВ. Данные, полученные с помощью ПЦР-РВ анализа, показали рост экспрессии генов транскрипционных факторов, влияющих на формирование эндокринных клеток поджелудочной железы в эмбриогенезе. Анализ экспрессии генов, характерных для различных типов клеток поджелудочной железы, показал, что дифференцировка преимущественно проходит в сторону образования  $\beta$ -подобных клеток. Было продемонстрировано, что использование культивирования в трехмерных условиях повышает эффективность дифференцировки КСЖ человека. С помощью иммуноферментного анализа было получено подтверждение глюкозозависимой секреции инсулина, что говорит о приближении фенотипа исследуемых клеток к эндокринным клеткам поджелудочной железы. С помощью экспериментальных моделей было выяснено, что при введении продукта внутрибрюшинно клетки имеют тропность к поджелудочной железе. На модели экспериментального диабета показано, что после



трансплантации суспензии клеток поднижнечелюстной слюнной железы происходит восстановление количества и общей площади островков Лангерганса и приближение этих параметров к таковым у здоровых животных. На моделях с использованием иммунодефицитных животных было показано, что в течение как минимум трех месяцев после подкожной инъекции суспензии клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека не наблюдалось смертности и признаков формирования опухолей. Кроме того, иммуногистохимические и гистологические исследования показывают отсутствие воспалительной реакции у мышей в месте трансплантации. Таким образом, клетки поднижнечелюстной слюнной железы демонстрируют возможности к трансдифференцировке в энтодермальном направлении и высокий уровень клеточной пластичности.

Финансирование исследования: *Государственное задание ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.*

#### **Дризе Н.И.**

*Национальный медицинский исследовательский центр гематологии  
ndrize@yandex.ru*

#### **МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИКЕ**

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) были описаны в 70-х годах прошлого века, получили свое название в 1991 г., охарактеризованы к 2006 г., а в настоящее время занимают 2-е место после стволовых кроветворных клеток по числу клинических протоколов, использующих стволовые клетки. В зарегистрированных протоколах имеется 23 направления, в которых используются МСК. Лечение различных заболеваний с помощью МСК основано на их основных свойствах: способности дифференцироваться в костную, хрящевую и жировые ткани; наличие трофической функции и способности к иммуномодуляции. За последние 15 лет стало очевидно, что в некоторых случаях клеточная терапия с помощью МСК бывает неэффективной. Вопросы с чем связаны неудачи и как интенсифицировать лечение с помощью МСК остаются актуальными и очень важными. Предпринимаются попытки модифицировать МСК с помощью ростовых факторов и генотерапии, которые пока не увенчались успехом. Цель данного исследования состоит в попытке анализа протоколов, использующих иммуномодулирующие свойства МСК для лечения аутоиммунных заболеваний и при аллогенной трансплантации костного мозга. Показано, что при различных заболеваниях данного типа эффективность лечения с помощью МСК составляет примерно 40–80%. Длительное время считалось, что так как на МСК слабо экспрессированы антигены HLA I класса и вообще не экспрессированы антигены HLAII класса, эти клетки не иммуногенны и могут быть использованы образцы, полученные от сторонних доноров независимо от их иммунофенотипа. Было показано, что при взаимодействии МСК с лимфоцитами в организме происходит резкое повышение экспрессии антигенов HLAII класса на их поверхности. Эти данные частично объяснили невозможность выявления донорских МСК в организме уже через 7 дней после

их введения. Стало очевидно, что эти клетки функционируют в организме в течение короткого времени и иногда «успевают», а иногда не способны эффективно лечить заболевание. При профилактике и лечении острой реакции трансплантат против хозяина после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с помощью МСК, полученных от донора стволовых кроветворных клеток, выяснилось, что не все МСК бывают эффективны, так же, как и при использовании МСК от стороннего донора. Возможно это связано не только с взаимодействием клеток донора и реципиента, но и зависит от индивидуальных свойств МСК. В образцах неэффективных МСК наблюдалось значительное снижение суммарной клеточной продукции и снижение относительного уровня экспрессии генов *CFH*, *FGFR1*, *PDGFRa* и *ICAM1* в них. Снижение уровня экспрессии *ICAM1* в неэффективных образцах МСК указывает на важность активности взаимодействия МСК с лимфоцитами реципиента. Помимо гуморальных факторов, выделяемых МСК, для эффективности их применения большое значение имеет их непосредственное взаимодействие с клетками иммунной системы. Дальнейшее детальное изучение механизмов взаимодействия МСК с клетками организма позволит создать протоколы более эффективного использования МСК.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ 16-04-00189, Грант РНФ 16-15-00102.*

#### **Ениколопов Г.**

*Stony Brook University  
Московский физико-технический институт  
Grigori.Enikolopov@stonybrookmedicine.edu*

#### **ПОДДЕРЖАНИЕ И ДЕЛЕНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО МОЗГА**

Нейральные стволовые клетки обеспечивают долгосрочную продукцию новых нейронов в мозге человека и животных. Рождение новых нейронов поддерживается лишь в нескольких областях взрослого мозга и уровень нейрогенеза снижается с возрастом, но и небольшое (по сравнению с общим числом нейронов взрослого мозга) число новообразованных нейронов необходимо для таких важных функций нервной системы как память и научение, реакция на продолжительный стресс и ответ на антидепрессантные терапии. Появление новых нейронов начинается с активации и деления покоящихся стволовых клеток и зависит от долгого каскада делений, отмирания, дифференцировки и встраивания в существующие нейронные цепи. Каждый из этих этапов может быть мишенью внутренних и внешних стимулов, влияющих на число и свойства новых нейронов.

Мы занимаемся изучением основных механизмов и закономерностей жизненного цикла стволовых клеток мозга и разработкой подходов к их визуализации и анализу. В докладе будут представлены новые результаты по тонкому анализу стволовых клеток и новых нейронов в гиппокампе, 4D визуализации процесса нейрогенеза и вовлечению новых нейронов в поведение. Наши данные говорят о том, что даже небольшие различия в делении и созревании нейральных стволовых клеток и их потомства могут привести к долгосрочным изменениям в тех функциях мозга, которые зависят от новообразованных нейронов.

**Животовский Б.**

Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
boris.zhivotovsky@ki.se

**ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ**

Гомеостаз органов и тканей поддерживается за счет взаимодействия между тремя физиологическими процессами: пролиферацией, дифференцировкой и гибелью клеток. В процессе развития организма, выполнив определенные функции, часть клеток элиминирует. В случае появления поврежденных каким-либо воздействием клеток система защиты организма также способна их уничтожить. В подобных ситуациях активно включается регенеративная система. Процессы дифференцировки и пролиферации лежат в основе контролируемой регенерации. Регенеративная способность некоторых клеток теряется во взрослом организме. В таком случае регенеративная медицина, основанная на применении стволовых клеток, может играть важную роль в восстановлении функции органов и тканей. Показано, что ограниченная регенеративная способность взрослых кардиомиоцитов является основным барьером для регенерации сердца. После инфаркта миокарда миофибробласты являются доминирующим типом клеток в зоне инфаркта. В данной ситуации перепрограммирование терминально-дифференцированных миофибробластов непосредственно в кардиомиоцитоподобные клетки может обеспечить достаточно успешную стратегию одновременного уменьшения рубцовой ткани и увеличения числа функциональных кардиомиоцитов. Совершенно ясно, что чувствительность как стволовых, так и терминально-дифференцированных клеток к программируемой гибели должна быть хорошо скоординирована. В течении последних лет накоплено много данных о роли апоптоза, одного из механизмов программируемой гибели клеток, в регуляции регенерации. Однако, в зависимости от ткани, могут активироваться различные от апоптоза механизмы гибели клеток. В настоящей работе будут обсуждены вопросы, касающиеся роли взаимодействия между различными механизмами гибели клеток в регуляции регенерации тканей и органов.

Финансирование исследования: РНФ (14-25-00056), Грант Президента (НШ-7082.2016).

**Никольский Н.Н., Люблинская О.Г.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
cellbio@incras.ru

**СТРОМАЛЬНЫЕ/СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ – БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ**

Стромальные/стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека были идентифицированы как источник самообновления эндометриальной ткани немногим более 10 лет назад. СКЭ являются разновидностью мезенхимных стромальных/стволовых клеток и отвечают всем критериям Международного общества клеточной терапии по определению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток человека. Источником для получения культур СКЭ служит биопсийный материал или десквамированный эндометрий доноров. Эти клетки отличаются высокой пролиферативной и дифференцировочной

способностью, что позволяет длительно поддерживать их в культуре с сохранением мультипотентности. В Институте Цитологии РАН первые культуры СКЭ были получены в 2009 г. и с тех пор активно используются как удобный экспериментальный объект для фундаментальных исследований в области биологии стволовых клеток и перспективный субстрат для клеточной терапии. За время исследования проанализирована реакция СКЭ на различные виды стрессовых воздействий (окислительный, тепловой, генотоксический стресс), исследован характер стресс-индуцированного и репликативного старения клеток, продемонстрирована возможность длительного культивирования клеток с сохранением их фенотипических и функциональных свойств. Комплексные исследования потомков СКЭ, переживших тепловой шок, включающие полнотранскриптомное секвенирование клеток, молекулярное карiotипирование и функциональные тесты, продемонстрировали сохранение мультипотентности и отсутствие признаков злокачественной трансформации клеток после стресса. Объем накопленных данных позволил идентифицировать СКЭ как безопасный и перспективный субстрат для разработки клеточных продуктов на основе этих клеток. Были проведены исследования по оценке корректирующего влияния СКЭ на экспериментальные патологии при трансплантации крысам, моделирующим заболевания эндометрия человека. Анализ частоты наступления беременности экспериментальных животных показал, что трансплантация СКЭ оказывает терапевтический эффект и позволяет преодолеть бесплодие животных, что позволяет рассматривать культуры СКЭ как перспективный клеточный материал для терапии бесплодия человека.

Финансирование исследования: грант РНФ № 14-50-00068.

**Киселев С.Л.**

Институт общей генетики РАН  
sl\_kiselev@yahoo.com

**ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) характеризуются неограниченным пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Источниками ПСК могут быть клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, тогда получают линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), или репрограммированные соматические клетки взрослого организма, которые получили название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Даже после проведения генетических манипуляций ЭСК и ИПСК сохраняют способность дифференцироваться во все типы клеток организма как *in vitro* так и *in vivo*. Это делает их уникальным объектом для изучения процессов, происходящих во время раннего развития или для исследований молекулярных событий при проявлении той или иной патологии. В докладе будут представлены результаты по изучению генетической стабильности линий ПСК, рассмотрены вопросы идентичности репрограммированных соматических клеток (ИПСК) и изогенных линий ЭСК и обсуждены вопросы соматической памяти при репрограммировании. Также, на примере орфанных заболеваний,

будут рассмотрены вопросы возможного практического использования репрограммированных соматических клеток для поиска лекарственных средств и использования технологии редактирования генома для создания персонализированного терапевтического продукта.

Финансирование исследования: *Поддержано субсидией Министерства образования и науки РФ проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184.*

#### **Медведев С.П.<sup>1-4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН

<sup>4</sup> «Новосибирский национальный

исследовательский государственный

университет»

medvedev@bionet.nsc.ru

#### **РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ И ТРАНСГЕНЕЗ ПРИ СОЗДАНИИ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

В настоящее время биомедицинская наука преодолевает порог нового синтеза знаний, который ведет к формированию медицины нового поколения. Мировой наукой накоплено множество знаний о структуре генома человека, а также функциях и особенностях работы его отдельных элементов. В то же время, огромный прогресс наблюдается в области клеточной биологии, особенно в направлении исследования стволовых клеток. В последнее десятилетие был найден новый способ получения культивируемых плюрипотентных стволовых клеток из дифференцированных клеток человека. Развитие технологий направленного редактирования нуклеотидных последовательностей геномов культивируемых клеток человека с помощью программируемых нуклеаз открывает новые перспективы создания биомедицинских клеточных продуктов. Это могут быть релевантные типы клеток с исправленным генотипом, которые можно получить из пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в результате направленной дифференцировки. Кроме того, возможно применение трансгеноза для создания клеток, обладающих определенной программой и специфичностью действия, например, с помощью CAR-технологии. Совокупность всех вышеперечисленных технологий и дает основу для формирования медицинских и фармакологических исследований нового уровня. Основой данных исследований является выявление маркеров для ранней диагностики заболеваний, персонализированный подход к терапии, раскрытие особенностей патологии у конкретных пациентов с использованием знаний о их геномах и особенностях их функционирования, а также получение аутологичного материала для заместительной клеточной терапии и тканевой инженерии. Кроме того, новые технологии формируют основу для создания фармакологии нового поколения, которая также способна использовать

более персонализированный подход для разработки лекарств, в том числе препаратов, предназначенных для терапии редких наследственных болезней. В докладе речь пойдет о перспективах, проблемах и собственном опыте использования систем направленного редактирования генов для создания клеточных моделей с заданными свойствами, которые предназначены для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза наследственных болезней человека.

Финансирование исследования: *Финансирование работы осуществлялось в рамках бюджетного проекта ФГБНУ Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН № 0324-2016-0003.*

#### **Папаценко Д.<sup>1</sup>, Лемиска И.<sup>2</sup>, Самосюк А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Сколковский Университет Науки и Технологии

<sup>2</sup> Медицинская школа Маунт Синай

dmitriy.papatsenko@gmail.com

#### **ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СУБПОПУЛЯЦИИ И САМООБНОВЛЕНИЕ ЭСК**

Вариабельность экспрессии генов в эмбриональных стволовых клетках мыши (ЭСК) *in vitro* является одним из факторов, ограничивающих их использование в медицине. Наблюдаемые изменения активности генов на уровне отдельных клеток могут складываться из нескольких компонент: 1. Ошибка измерений, 2. Наличие субпопуляций — альтернативных состояний ЭСК, обусловленных альтернативными состояниями активности генной сети плюрипотентности (ГСП), 3. Стохастичность экспрессии генов плюрипотентности. С точки зрения улучшения качеств ЭСК *in vitro* интерес представляет определение композиции популяций ЭСК, поддерживаемых в различных условиях (serum + LIF, 2i), а также определение условий, которые могут способствовать уменьшению стохастичности экспрессии генов плюрипотентности. Нами был проведено исследование вариабельности экспрессии 48 генов плюрипотентности в 700 индивидуальных ЭСК мыши на чипах фирмы Fluidigm (R). Нормализованные данные были проанализированы при помощи различных методов, в том числе кластерного анализа. Согласно данным анализа, популяция ЭСК, поддерживаемая в присутствии serum + LIF состоит из 2х субпопуляций клеток, одна из которых фенотипически ближе к ВКМ (внутриклеточная масса), а другая — к эпобласту. В то же время, в присутствии ингибиторов (условия 2i) субпопуляции были неразличимы, что, возможно, объясняет более низкий уровень вариабельности экспрессии генов плюрипотентности в условиях 2i. На основании анализа активности генной сети плюрипотентности и обнаруженных субпопуляций нами была предложена биологическая модель динамического обмена состояниями в культуре ЭСК (serum + LIF), которая, возможно, указывает на механизм самообновления ЭСК *in vitro*.

## УСТНЫЕ И ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

### **Abakushina E.<sup>1</sup>, Otoi T.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Clinical Immunology,  
Medical Radiological Research Center,  
Obrninsk, Kaluga reg. Russia*

<sup>2</sup> *Laboratory of Animal Reproduction,  
The United Graduate School of Veterinary  
Sciences, Yamaguchi University  
abakushina@mail.ru*

### **ISOLATION AND CULTURE OF BOVINE EARLY FOLLICLES GROWN IN COLLAGEN MATRIX GEL**

One of the new technologies attracting the attention of reproductive technologists in recent times is the isolation and the culture of preantral ovarian follicles from ovarian tissue for using them as an alternate source of fertilizable oocytes to produce embryos. Well known that the mammalian ovary contains a huge stock of resting follicles. A very small number of these oocytes grow to the final size, mature, and are ovulated. The aim of study was to establish a culture system to support the growth of small bovine oocytes as enclosed in granulosa cell complexes that extend in a three-dimensional collagen matrix supports a spherical structure of follicles and to determine the optimal conditions for in vitro growth and fertilization of early antral animal follicles. Such systems have been established for mouse oocytes but are not applicable to larger animals because it is difficult to maintain an appropriate association between the oocytes and companion somatic cells. The objectives of the study were to investigate the relationship between the morphological statuses of collagen embedded early antral follicles and conditions of culture of the oocytes. In the present study, we compared five culture conditions for growing bovine oocytes and examined the effect of hypoxanthine and hormone on oocytes growth. The oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were embedded in collagen gels and cultured for 7 days in 4 different culture systems. When hypoxanthine (4 mM) and FSH (0.02 µg/ml) were added to the culture medium, the number of granulosa cell-enclosed oocytes increased significantly. As result more oocytes enclosed by a complete cell layer and form follicle like structures were recovered from the medium. The percentage of follicles like structures in this case was 82.9%. After a subsequent maturation culture of the oocytes, 84.2% underwent germinal vesicle breakdown and 14.3% of oocytes were fertilized. The viability of the oocytes to day 8 of culture was 73.1%. The results of in vitro growth of early bovine oocytes in a three-dimension structure demonstrate that using of combination of hypoxanthine with FSH in cultural media can maintained in the complex that developed follicle like structure similar to that observed in ovary. The culture system has the potential to form the basis of oocytes in vitro growth system for the production of mature oocytes and the defined nature of the system makes it suitable as a tool for investigating early oocytes development. Finally, the culture of intact follicles within ovarian stromal tissue provides a unique opportunity to examine the regulation of cell differentiation and follicle growth, particularly at preantral stages. Our experiments suggest that it may be more difficult to main-

tain the proper association between the oocytes and granulosa cells on a collagen substrate in large animal species and the conditions of growth and fertilization in vitro should be improved and requires addition in-depth study.

*Acknowledgements: The authors would like to acknowledge the support of The Matsumae International Foundation (Japan) № 2008-06 and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (Japan) № L-09565.*

### **Amberg R., Witte F.**

*Charité – Universitätsmedizin Berlin  
romina.amberg@charite.de*

### **MIGRATION ASSAY OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS ON A BIODEGRADABLE MAGNESIUM SURFACE**

**INTRODUCTION:** Since several years there is a high interest in magnesium as biodegradable metal implants for dentistry due to their excellent biocompatibility and their low elastic moduli, similar to natural bone, which prevent stress shielding. The integration of gingival tissue at the implant abutment plays a crucial role for implant success. The aim of this study was to investigate the migration of human gingival fibroblasts (HGF) on magnesium. Therefore, a migration assay adjusted to the specific requirements of magnesium has to be developed.

**METHODS:** Primary HGF, labelled with fluorescent dye Cell-Tracker Red were cultivated for 24 h. Cells were seeded in 24-well-plate on plastic as control and pre-corroded magnesium foils by using a silicone insert and were allowed to attach for 24 h to form a confluent monolayer. Before seeding, each slide was "pre-corroded" in 10 mL culture medium for 3 days at 37°C without CO<sub>2</sub> exchange. After scratching and washing the monolayer, the slides were placed with the attached cell-site down. Imaging was started using an inverted microscope with a live cell imaging system over a period of 50 hours.

**RESULTS & DISCUSSION:** This study shows the first migration assay developed for biodegradable magnesium. Pre-corrosion of the magnesium led to an overall increased cell adhesion and facilitated the migration assay. The migration of HGF on magnesium is about 1.7x times slower than on tissue culture plastic, but even faster than on titanium-zirconium surfaces of similar roughness. This assay has now been established as a tool to optimize biodegradable magnesium surfaces.

*Acknowledgements: The authors acknowledge the support of the Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Medicine (BCRT).*

### **Benlidayi E.**

*Cukurova University  
emrebenlidayi@yahoo.com*

### **STANDARDIZED DEFECT SHEEP MODELS AS A PREREQUISITE FOR OVINE NCSCS BONE REGENERATION RESEARCH**

The use of animal models is an essential step in the testing of new biomaterials prior to use in humans. There are many animal models for bone regeneration

research, each having differences in bone remodelling and bony architecture, with potential advantages and disadvantages. Sheep have been used as an animal model for various fields of biomedical research. Mandibular defect models and extraoral models in sheep, including tibia, lower femur, and maxillary sinus have been investigated. These models allow us to compare osseous healing in different bone types (trabecular cancellous bone or dense cortical bone). Bone tissue engineering using ovine NCSCs offers a promising strategy for healing severe bone injuries by utilizing the body's natural biological response to tissue damage in conjunction with engineering principles. Therefore, we decided to test the potential of this biological strategy for tissue-healing enhancement in a big animal model, the standardized defect sheep model, in order to have clear indications on the most suitable augmentation approach for a future clinical application.

**Busuioc C.<sup>1</sup>, Miu D.<sup>2</sup>, Jinga S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University POLITEHNICA of Bucharest

<sup>2</sup> National Institute for Laser, Plasma and Radiation Physics  
crisrina.busuioc@upb.ro

**VITROCERAMIC COATINGS OBTAINED BY MEANS OF LASER ABLATION, WITH APPLICATIONS IN DENTISTRY AND ORTHOPEDICS**

In dentistry and orthopedics, metals and alloys are the most used inert materials for bone substitution because of their excellent mechanical properties. However, there is the possibility of adverse reactions due to surface corrosion in the physiological environment. Thus, to make metallic implants more biocompatible, they are coated with layers of different natures: polymeric, glassy, ceramic etc. In this context, exploring new bioactive vitroc ceramic coatings containing both a glassy matrix and a distribution of crystals seems to be an appropriate solution for performance improvement. The synthesis of the mentioned materials was performed by a physical deposition method, namely laser ablation. After setting the oxide compositions, the processing parameters were optimized in order to attain high quality vitroc ceramic films on top of Ti or Ti-Zr substrates. By employing a vitreous matrix with amorphous structure, the material is prone to cover itself with a thin layer of silica gel after dissolution in the physiological environment, which favors the deposition of apatitic phases. On another hand, the presence of embedded crystalline phases may lead to an increased biocompatibility. The material properties were investigated by X-ray diffraction, electron microscopy and associated techniques, FT-IR and Raman spectroscopy, as well as biological tests, providing information on structure, morphology, biocompatibility and bioactivity.

Acknowledgements: University POLITEHNICA of Bucharest, Internal Research Programme GEX2017, Project "Vitroc ceramic Biocoatings" (BioVitros).

**Newton P.<sup>1</sup>, Li L.<sup>1</sup>, Xie M.<sup>1</sup>, Adameyko I.<sup>1</sup>, Savendahl L.<sup>1</sup>, Chagin A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Karolinska Institutet

<sup>2</sup> Sechenov University  
andrei.chagin@ki.se

**A RADICAL SWITCH IN CLONALITY REVEALS THE FORMATION OF A STEM CELL NICHE IN THE EPIPHYSEAL GROWTH PLATE**

The majority of disorders affecting final height converge on thin cartilage discs, called growth plates or epiphyseal plates, which are located near the ends of all growing long bones. Growth plates provide a continuous supply of cells that are crucial for the maintenance of normal bone growth. However, how these discs maintain themselves is not known. The generally accepted view is that chondro-progenitors within the growth plate fulfill this function and the consumption of these progenitors leads to the fusion of the growth plate and the cessation of growth. However, this has never been functionally proven. Employing clonal genetic tracing, we show here that in mice longitudinal growth during the fetal and neonatal period occurs via small clones arranged into multi-clonal columns. Such a clonality pattern strongly supports the idea of direct depletion of the progenitors during fetal and neonatal bone growth. In contrast, later in life the clonal pattern drastically changes, with mono-clonal chondrocyte columns formed and a 2-5 fold increase in clone size. This radical switch in clonality suggests that chondro-progenitors acquire a capacity to renew themselves, as no other drastic changes in cell kinetics can be observed. Interestingly, this self-renewal behavior coincides with the formation of the secondary ossification center, the expression of stem cell markers and of symmetric cell divisions. Furthermore, we show that these self-renewing progenitors can be expanded by specifically activating the mTORC1-signaling pathway in the growth plate, suggesting a novel target for the development of new treatments of growth disorders. Thus our data suggest that a stem cell niche is formed postnatally in the epiphyseal growth plate and that this niche is essential for the maintenance of postnatal bone growth.

Acknowledgements: The Swedish Research Council, Sechenov University, Karolinska Institutet

**Cucuruz A., Busuioc C., Voicu G.**

University POLITEHNICA of Bucharest  
andreiailie@yahoo.com

**VITROCERAMIC THIN FILM COATINGS DEPOSITED ON METALLIC SUBSTRATES BASED ON TI BY LASER ABLATION**

Pulsed laser deposition (PLD) method is used to deposit bioceramic thin film coatings on metallic substrates. In our research, we used this method to deposit abiovitroc ceramic thin film coating on titanium or Ti-Zr alloy substrates. The composition of the oxidic targets was selected from SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-(CaF<sub>2</sub>) systems and the corresponding masses were prepared using the sol-gel method and then pressed and thermal treated at 1300°C for 2 h, in oxidative atmosphere. The depositions by PLD method were performed in oxygen-rich atmosphere (100 mTorr) and the metallic substrates were heated at 400°C. The films were analysed by different experimental techniques: X-ray diffraction, electron microscopy (scanning – SEM, EDX and transmission – HRTEM, SAED) and infrared spec-

troscopy coupled with optical microscopy. Also, they were biologically tested by in-vitro tests (MTT cell proliferation assay, optical and fluorescence microscopy) and determination of the contact angle. The results indicated a high biocompatibility of these materials regardless of the metallic substrate, demonstrating their potential use for biomedical applications.

Acknowledgements: *University POLITEHNICA of Bucharest, Internal Research Programme GEX2017, Project "Vitroceramic Biocoatings" (BioVitros). The electron microscopy analyzes/images obtained on the samples were possible due to EU-funding project POSCCE-A2-02.2.1-2013-1/Prior.*

**Didenko N.N., Grimm W.-D.**

*Stem Cell Lab, Stavropol State Medical University  
nikolai.n.didenko@gmail.com*

**CD 271-BASED MAGNETIC ISOLATION OF OVINE NCSCS**

**OBJECTIVES:** So far, despite their high promise, current stem cell therapies are still experimental, expensive and harbour several risks including immunological issues, risk of tumour formation or transmission of pathogens in an allogenic setup. A new non-immunogenic stem cell type able to undergo osteogenic differentiation are craniofacial (oral) NCSCs.

**METHODS:** Most of NCSCs populations can be isolated and enriched using magnetic cell separation (e.g. CliniMACS) based on their expression of the cell surface marker CD271. This technique allows isolating ovine NCSCs from different oral compartments. Ovine palatal tissues were isolated as described by Zeuner et al. 2017. The yield and purity of the MACS-separation was assessed using flow cytometry.

**RESULTS:** Our preliminary data suggest that ovine NCSCs are present in the ovine palate and that magnetic separation is a feasible method to enrich oral NCSCs. After isolation, oNCSCs form neurospheres, express neural crest markers (e.g. HNK-1, Slug) and differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic cells.

**Favaro E., Lopatina T., Occhipinti S., Giovarelli M., Romagnoli R., Porta M., Camussi G., Zanone M.**

*University of Turin  
enrica.favaro@unito.it*

**EXTRACELLULAR VESICLES FROM ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS ACTIVATE A PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE IN T CELL FROM TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETIC PATIENTS**

**BACKGROUND AND AIMS** The concept of immune-mediated inflammatory disease is established for type 1 diabetes, but recent evidence indicates type 2 diabetes as an auto-inflammatory disease, with signs of insulinitis as well. Adipose tissue is the largest endocrine organ with immune function and adipocyte dysfunction correlates with the development of insulin-resistance type 2 diabetes and with impaired micro- and macrovascular function. On the other hand, studies in animal models of type 1 diabetes reveal that adipocyte dysfunction and high levels of inflammatory cytokines can directly play a role in the onset and progression of the type 1 diabetes. Angiogenesis and cell therapy studies indicate that adipose-derived stem cells (ASCs) hold

promise amongst stem cells of mesenchymal lineage, acting through paracrine mechanisms possibly involving the release of extracellular vesicles (EVs), a recognised integral component of the cellular network. Paralleling previous in vitro studies using EVs derived from bone-marrow mesenchymal stem cells (MSCs) indicated the promotion of an anti-inflammatory T cell response. We evaluated whether EVs derived from ASCs may effect inflammatory response in type 1 and type 2 diabetes, acting on T cell. **MATERIALS AND METHODS** EVs were purified from heterologous human subcutaneous adipose mesenchymal stem cells (ASCs) obtained from healthy donors by differential centrifugation. Protein array and gene array analysis showed high expression of some pro-inflammatory factors such as IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-17 and IL-6 and microRNA miR-126 in EVs. PBMCs were obtained from 6 patients with recent onset type 1 diabetes and 6 patients with long standing type 2 diabetes on metformin. Cultures were established with PBMCs and ASC-EVs for 48 hours in type 1 and type 2 diabetic patients. Responses to GAD65 stimulation were assessed by IFN- $\gamma$  ELISPOT analysis in type 1 patients. Levels of cytokines were measured in the supernatant by ELISA and by intracellular flow cytometry analyses. T helper 17 (Th17) analysis was performed by flow cytometry analyses. **RESULTS:** ASC-EVs were internalised by PBMCs, as assessed by confocal microscopy and flow cytometry analyses. ASC-EVs increased IFN- $\gamma$  spots in GAD65-stimulated PBMCs obtained from type 1 diabetes. Moreover, ASC-EVs increased levels of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  in PBMCs obtained from type 1 and type 2 diabetes, and decreased transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) levels. Furthermore, ASC-EVs increased the number of Th17 cells and the levels of IL-17. **CONCLUSIONS** ASC-EVs appear to lack the antigen and non-antigen specific anti-inflammatory effects of MSCs, and induce a pro-inflammatory phenotype in T cells. In the context of type 1 diabetes, ASC-EVs may contribute to increased levels of cytokines thus inducing  $\beta$  cell death, inhibit insulin production and possibly contributing to the loss of self-tolerance. In type 2 diabetes may contribute lipotoxicity and exacerbate inflammation, also in the context of pancreatic islets.

**Feichtinger G.**

*University of Leeds, Leeds, UK  
g.feichtinger@leeds.ac.uk*

**GENE-ACTIVATED MATRICES (GAMS) – CONCEPT, LIMITATIONS AND FUTURE DEVELOPMENTS**

Gene-activated matrices (GAMs) were described for the first time >15 years ago. These systems are combinations of biomaterials with gene therapeutics for application in regenerative medicine. Ideally, these implantable or injectable materials would offer efficient, preferably non-viral, gene delivery of active morphogens for effective regeneration whilst providing a biocompatible carrier matrix, which constitutes an environment supporting tissue regeneration. Despite initial promising results and high expectations for future therapeutic use, there are still no approved products in clinical use. This scenario potentially represents both an untapped opportunity for drug developers and a potential dead end in clinical translation.

This presentation will therefore provide an overview of previously investigated approaches and types of

GAMs, detail background information on the history of GAM development as well as describe potential mechanisms of drug delivery using GAMs. Furthermore, current concepts of advanced GAMs from our own work and those of other groups, and currently performed clinical studies will be presented. This information will be discussed in context with current developments in the field and risks associated with clinical translation. It will highlight potential issues within the preclinical development stage, regulatory hurdles and the reasons why adoption of these promising advanced therapeutic medicinal products (ATMPs) into clinical practise is not a straightforward process. Finally, this presentation will provide an outlook for future advanced versions of GAMs and their potential for the treatment of musculoskeletal disorders.

**Giesenhausen B.<sup>1</sup>, Fritsch T.<sup>2</sup>, Nord T.<sup>3</sup>, Grimm W.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> University of Frankfurt/M

<sup>2</sup> Gesundheitscampus Luzern / St. Elisabeth University Bratislava

<sup>3</sup> Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Abtlg. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

<sup>4</sup> Witten/Herdecke University  
prof\_wolf.grimm@yahoo.de

#### **NEURAL CREST-DERIVED STEM CELL HOMING AND BONERINGS-AUGMENTATION IMPROVE BONE REMODELING**

**Objectives:** The use of neural crest-derived stem cells present within the human palate (Widera et al. 2009) could be a future trend to induce osteogenetic processes within regenerative dentistry. The purpose of this study was to evaluate the potential of adult palate as a novel source of stem cells in combination with transplantation of allogeneic cortico-spongiosa bone rings for one-stage bone augmentation and immediate implant placement. **Methods:** We used allogeneic bone rings as and combined them with subepithelial soft tissue from the palate. 15 subjects were included (ethics committee, Muenster, Germany, f-s, 17/02/2014). 11 patients were allocated to the 3 months healing group (upper jaw subgroup) and 4 patients to the 4 months healing group (lower jaw subgroup). Qualitative histological analysis on non-decalcified sections using Technovit 9100 New as a PMMA-based embedding technique (Witte et al. 2010) with different stains was carried out. The standard deviation was set to  $\pm 12\%$ , the alpha error to 0.05, and the power of the test to 0.80. **Results:** In both subgroups, 3 months and 4 months, the remaining particles of the bone substitute material were closely surrounded by newly formed bone. A magnification of those areas revealed specific cells generally involved in bone regenerating processes (osteocytes, osteoblasts and osteoclasts), osteoid, vessels, and collagen connective tissue. The mean percentage of mineralized bone in the augmented area was in the subgroup "upper jaw"  $23.82 \pm 7.18\%$  ( $n = 24$ ) and  $23.62 \pm 6.36$  ( $n = 19$ ) in the subgroup "lower jaw." The mean percentage of remaining bone substitute material was  $29.00 \pm 5.62$  ( $n = 24$ ) in the subgroup "upper jaw" and  $33.90 \pm 7.42$  ( $n = 19$ ) in the subgroup "lower jaw". **Conclusions:** Induced homing of NCSCs from the palate of the patients overcome some of the key scientific, technical, commercialization, and regulatory issues associated with stem cell transplantation, such

as potential contamination, excessive costs, immune rejection, pathogen transmission, and a lack of training of current clinicians to handle cells.

**Grimm W.-D.**

Witten/Herdecke University  
prof\_wolf.grimm@yahoo.de

#### **NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS AS A TOOL IN REGENERATIVE MEDICINE**

Recent development in regenerative medicine and cell-based therapy have brought encouraging perspectives for the use of stem cells in clinical trials. Multiple types of stem cells, from progenitors to pluripotent stem cells, have been investigated. Adult neural crest-derived stem cells (NCSCs) were long term believed to be an in vitro phenomenon similar to embryonic stem cells derived from the inner cell mass of a blastocyst. During the last 15 years, however, an emerging line of evidence supported the hypothesis that at least a limited number of adult NCSCs may exist in the human body even in the adulthood. Remarkably, such adult NCSCs perform self-renewal and exhibit a differentiation potential comparable to their embryonic counterparts. In particular they can give rise to neurons, melanocytes, bone cells and cartilage. They represent an interesting adult stem cell source because they are present in significant numbers in craniofacial tissues compared to other adult stem cell sources. This lecture will provide a general overview about NCSCs and their clinical potential.

**Gryadunova A.A., Mironov V.A.**

Sechenov University, Institute for Regenerative Medicine; Private Institution Laboratory for Biotechnological Research 3D Bioprinting Solutions  
zharnitskaya\_anna@mail.ru

#### **TENSIOMETRIC ESTIMATION OF MATERIAL PROPERTIES OF CHONDROSPHERES**

**Introduction** Tissue spheroids have been proposed for the use as building blocks in biofabrication or as bioink in 3D bioprinting technologies [1]. The use of chondrospheres is a promising technique for the repair of cartilage defects. Tissue fusion is ubiquitous phenomenon during embryonic development. Diomimetic spheroid's self-assembly is a fundamental principle of emerging organ printing technology since closely placed cell aggregates could form functional engineered constructs within fusion permissive hydrogel [2, 3]. From physical point of view spheroids could be considered as a visco-elastic-plastic soft matter or complex fluid. We hypothesize that the estimation of their material properties using tensiometry could predict spreading and fusion behavior as well as provide a powerful insight about post-printed engineered constructs compaction and maturation. **Materials and Methods** The mechanical properties of tissue spheroids were measured using a micro-scale parallel-plate compression testing system and associated SquisherJoy software. The force-displacement data obtained from the compression test were converted to stress-strain curves and the lower portion of the curve (0-20% strain) was used to obtain a linear regression line and estimate the Young's moduli. **Results** It has been shown that material properties of tissue spheroids biofabricated from sheep chondrocytes have various modulus of

elasticity or Young's moduli. The increasing elasticity of chondrospheres correlates very well with the growing deposition and accumulation of extracellular matrix, confirmed by expression of collagen type II and glycosaminoglycans. No significant correlation between material properties of tissue spheroids and their spreading kinetics was observed. However, there is a certain correlation between material properties of tissue spheroids and their fusion kinetics. Conclusion Our data demonstrated that besides well established role of cell-to-cell interactions in the realization of cell cohesion inside tissue spheroids structural determinants such as actin microfilaments and gradually accumulating extracellular matrix are important. Material properties of tissue spheroids determine their tissue fusion kinetics but do not correlate with their spreading kinetics. It is possible to predict post-printing fusion behaviour of 3D structures based on preliminary estimation of their material properties. It has been shown that mechanical properties of tissue spheroids correlate strongly with their viability. Thus, tensiometry is a valuable method for systematic characterization of tissue spheroids material properties and for prediction of their post-printed fusion behavior.

*References:*

1. Mironov V., Visconti R. P. *Biomaterials* 2009; 30; 2164-2174.
2. Fleming P. A., Argraves Dev Dyn. 2010; 239(2); 398-406.
3. Jakab K., Neagu A., Mironov V. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101(9); 2864-2869.

**Hippenmeyer S.**

*IST Austria*

simon.hippenmeyer@ist.ac.at

**MOLECULAR MECHANISMS OF NEURAL STEM CELL LINEAGE PROGRESSION**

The concerted production of the correct number and diversity of neurons and glia is essential for intricate neural circuit assembly. In the developing cerebral cortex, radial glia progenitors (RGPs) are responsible for producing all neocortical neurons and certain glia lineages. We recently performed a quantitative clonal analysis by exploiting the unprecedented resolution of the genetic MADM (Mosaic Analysis with Double Markers) technology and discovered a high degree of non-stochasticity and thus deterministic mode of RGP behavior. However, the cellular and molecular mechanisms controlling the precise pre-programmed RGP lineage progression through proliferation, neurogenesis and gliogenesis remain unknown. To this end we use quantitative MADM-based experimental paradigms at single RGP resolution to define the sequential non-cell-autonomous and intrinsic cell-autonomous functions of candidate genes and signalling pathways controlling RGP-mediated cortical neuron and glia genesis and postnatal stem cell behavior.

*Acknowledgements: IST institutional funds, EC CIG, HFSP program grant, n[f+b] grant, ERC consolidator grant.*

**Hsu M.**

*National Tsing Hua University*

peter5552345@hotmail.com

**ADIPOSE-DERIVED STEM CELL SHEETS FUNCTIONALIZED BY HYBRID BACULOVIRUS FOR PROLONGED GDNF EXPRESSION AND IMPROVED NERVE REGENERATION**

Peripheral nerve regeneration requires coordinated functions of support cells (e.g. Schwann cells) and neurotrophic factors such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), but nerve regeneration is usually far from complete. Here we constructed a Cre/loxP-based hybrid baculovirus (BV) vector which enabled intracellular formation of episomal DNA minicircle for effective transduction of rat adipose-derived stem cells (ASCs) and prolonged expression of functional GDNF capable of recruiting Schwann cells. The GDNF expression persisted for >20 days with the peak level (128 ng/ml) tremendously exceeding the picogram levels of GDNF secreted by neuroprogenitor cells. We further developed a facile method to fabricate and transduce cell sheets composed of undifferentiated ASCs in 2 days, without the need of thermo-responsive polymer commonly used for cell sheet fabrication. Implantation of the hybrid BV-engineered, GDNF-expressing ASCs sheets into sciatic nerve transection site in rats significantly improved the nerve repair, as judged from the enhanced functional recovery, nerve reinnervation and electrophysiological functionality, prevented muscle atrophy, augmented Schwann cells infiltration, axon regeneration, myelination and angiogenesis. The hybrid BV is able to functionalize ASCs sheets by intracellular episomal DNA minicircle formation that circumvents undesired gene integration, and the ASCs sheets fabrication is rapid and simple. These data and features implicate the potentials of ASCs sheets functionalized by the hybrid BV for peripheral nerve regeneration.

**Ivanova E.Y.<sup>1,2</sup>, Selenina A.V.<sup>2</sup>, Bakhmet E.I.<sup>2</sup>, Sinenko S.A.<sup>2</sup>, Tomilin A.N.<sup>1,2</sup>, Tsimokha A.S.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Saint Petersburg State University*

<sup>2</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences*

ivanova.027@gmail.com

**THE INVESTIGATION OF PROTEASOMES AND IMMUNOPROTEASOMES INVOLVEMENT IN MAMMAL CELL DIFFERENTIATION**

A multisubunit protein complex responsible for selective protein degradation in the cell is termed "26S proteasome". This complex plays important functions in various biological processes such as transcription, progression through the cell cycle, signal transduction, cell death, immune responses, metabolism, protein quality control and development. The 26S proteasome is composed of a 20S core particle possessing proteolytic activity and one or two 19S regulatory complexes. Proteasome population in the cell is structurally and functionally heterogeneous. In mammals, there also exists an immunoproteasome in which constitutive catalytic subunits  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 5$  to be replaced with alternate  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$  subunits, respectively. The immunoproteasome is believed to generate peptides specifically cleaved for antigen presentation. Recent data showed an increased gene expression of immunoproteasome subunit  $\beta 5i$  in mouse embryonic stem (ES) cells during cell differentiation. The purpose of our study was to



determine whether immunoproteasomes participate in cell differentiation. The experiments were carried out on the murine ES cell line E14 and cell differentiation was induced by removal of leukemia inhibitory factor (LIF) and adding retinoic acid to growth medium. The expression of pluripotent markers such as Oct4 and Nanog was analyzed by quantitative PCR and immunocytochemistry. We confirmed that ES cells started to lose these markers 48 hours after the induction of differentiation. The expression of proteasomal subunit  $\beta 5$  and immunoproteasome subunits  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$  was also analyzed by quantitative PCR. We found that the level of  $\beta 2i$  slightly increased in differentiated cells while stem cells did not express immunoproteasome genes at all. However, the level of constitutive proteasome subunit  $\beta 5$  was similar in undifferentiated and differentiated cells. Our study reveals a possible role of immunoproteasomes during mammal cell differentiation.

Acknowledgements: *This work was supported by RSF 16-04-10343.*

**Kim Y.S., Kim Y.I.**

*Gangnam Yonsei Sarang Hospital  
yonserangihc@naver.com*

#### **MESENCHYMAL STEM CELL IMPLANTATION IN OSTEOARTHRITIC KNEES IS FIBRIN GLUE EFFECTIVE AS A SCAFFOLD?**

**BACKGROUND:** The cell-based tissue engineering approach that uses mesenchymal stem cells (MSCs) has addressed the issue of articular cartilage repair in osteoarthritic (OA) knees. However, to improve outcomes, an advanced surgical procedure with tissue-engineered scaffolds may be needed to treat patients with large cartilage lesions. **PURPOSE:** To investigate the clinical and second-look arthroscopic outcomes of the implantation of MSCs loaded in fibrin glue as a scaffold in patients with OA knees and to compare these outcomes with those of MSC implantation without a scaffold. **STUDY DESIGN:** Cohort study; Level of evidence, 3. **METHODS:** This study retrospectively evaluated 54 patients (56 knees) who were examined with second-look arthroscopy after MSC implantation for cartilage lesions in their OA knees. Patients were divided into 2 groups: 37 patients (39 knees) were treated with MSC implantation without a scaffold (group 1), and 17 patients (17 knees) underwent implantation of MSCs loaded in fibrin glue as a scaffold (group 2). Clinical outcomes were evaluated according to the International Knee Documentation Committee (IKDC) score and the Tegner activity scale, and cartilage repair was assessed with the International Cartilage Repair Society (ICRS) grade. Statistical analyses were performed to identify various prognostic factors associated with the clinical and second-look arthroscopic outcomes. **RESULTS:** At final follow-up (mean, 28.6 months; range, 24-34 months), the mean IKDC score and Tegner activity scale in each group significantly improved: group 1, from  $38.1 \pm 7.7$  to  $62.0 \pm 11.7$  (IKDC) and from  $2.5 \pm 0.9$  to  $3.5 \pm 0.8$  (Tegner); group 2, from  $36.1 \pm 6.2$  to  $64.4 \pm 11.5$  (IKDC) and from  $2.2 \pm 0.8$  to  $3.8 \pm 0.8$  (Tegner) ( $P < .001$  for all). According to the overall ICRS cartilage repair grades, 9 of the 39 lesions (23%) in group 1 and 12 of the 17 lesions (58%) in group 2 achieved a grade of I or II. There was a significant difference in ICRS grades between the groups

( $P = .028$ ). Overweight (body mass index  $\geq 27.5$  kg/m<sup>2</sup>) and large lesion size ( $\geq 5.7$  cm<sup>2</sup>) were significant predictors of poor clinical and arthroscopic outcomes in group 1 ( $P < .05$  for both). There was a similar trend in group 2, but the differences were not significant, possibly owing to the smaller sample size. **CONCLUSION:** Clinical and arthroscopic outcomes of MSC implantation were encouraging for OA knees in both groups, although there were no significant differences in outcome scores between groups. However, at second-look arthroscopy, there were better ICRS grades in group 2.

**Kirkpatrick C.J.**

*Goethe University of Frankfurt  
kirkpatrick@uni-mainz.de*

#### **POSSIBILITIES AND CHALLENGES FOR IN VITRO MODELS IN REGENERATIVE MEDICINE RESEARCH**

In regenerative medicine biomaterials are essential components and embrace all classes of materials from metals through ceramics to polymers. Understanding how biomaterials affect regenerative processes is a major issue in their design, and involves in vitro and in vivo model systems to help unravel the underlying biological mechanisms. These models also need to serve as relevant testing systems prior to clinical application. Based on the working hypothesis that cells are Nature's prime signal delivery systems, we have endeavored to study cellular crosstalk by establishing suitable human co-culture models. The latter have concentrated on an essential element of healing, namely, vascularization, which especially in the case of extensive tissue loss, is a major limiting step in regeneration. Thus, in studying bone regeneration human osteoblasts in co-culture with human microvascular or progenitor endothelial cells (EC) demonstrate characteristic molecular interactions as a result of mutual stimulation to yield microvascular structures, which can also be formed on a 3D biomaterial scaffold in vitro. The resulting microvessels can be rapidly engineered into the host microcirculation (inosculation) on implantation in vivo. More recent research involves the role of the initial inflammatory reaction, indicating that pro-inflammatory macrophages can accelerate this vascularization process. Further co-culture models have been established for the skin and lung, e.g. the air-blood barrier, which is of interest for nanomedicine, as nanoparticles containing medication could be transported into the body by an inhalational route. The most complex of these air-blood barrier models involves the incorporation of macrophages, the rationale being that these cells are also present in the lung alveoli. A co-culture model of the blood-brain-barrier is also a focus of our research. It is hoped that such systems can be useful in developing new translational approaches in regenerative medicine, as they represent a higher level of complexity than simple monocellular systems. Nevertheless, a major future challenge is to develop suitable in vivo models as proof of principle for clinical translation.

Acknowledgements: *This research was supported by grants from the German Research Foundation (DFG), the German Federal Ministry of Education & Research (BMBF), the German-Israeli Foundation (GIF) and the European Commission.*

**Klimenko O.V.***SID ALEX GROUP Ltd.*

O\_klimenko@rambler.ru

**SMALL NON-CODING RNAS AS TOOLS FOR REGENERATIVE MEDICINE**

MiRNAs and pi-RNAs are small non-coding RNAs (sncRNAs), is a class of small regulatory molecules with length <200 nucleotides. SncRNAs is a respectable family of non-protein coding regulatory RNAs, which modifies genetic program of cells. One part of sncRNAs acts in nucleus; another part regulates extranuclear processes. Using the combination of sncRNAs with different mechanisms of action may results in full reprogramming of any type of cells. The main regulatory mechanisms are: RNA interference with silencing of specific target genes; Mobile genomic transposable elements repression; Supporting of genome stability after cancer cell transformation (suppression of NAHR – non-allelic homologous recombination, regulation of DNA methylation and histone modification); Reversible post-transcriptional gene inhibition of specific genes by sncRNAs. Some sncRNAs are expressed ubiquitously, but many are tissue and differentiation stage-specific. SncRNAs have been aptly referred to as "rheostats" because their regulatory role is generally to fine-tune, but not abolish, protein expression. Most piRNAs are complementary to transcripts of and able to inhibit expression of retrotransposon mRNAs and represses the mobile genomic transposon elements (TE) to protect the integrity of the genome. Piwi protein is a typical suppressor of position effect variegation, similar to other key epigenetic factors such as HP1 and interacts with other key epigenetic factors. Piwi deficiency results in global loss of methylation of histone 3 at lysine 9 and the delocalization of HP1 from polytene chromosomes and loss of euchromatic features at a sub-telomeric region of chromosome 3R. Piwi and its homologs are key components of an epigenetic regulatory complex required for euchromatin/heterochromatin assembly. Moreover, miRNAs can modify cellular proliferation, differentiation and death. Results: In the recent studies, were investigated influences of separated micro-RNAs (miRNAs) and their antago-miRNAs, piRNAs and antago-piRNAs (more than 40 sequences) on the morphology and genetics of leukemic cells, colorectal adenocarcinoma cells, lung cancer cells, neuroblastoma, glioblastoma, skin adenocarcinoma cells. We firstly observed transformation of cancer cells into different types of mature cells. These transformations were obtained after modification of cancer cells into intermediate stem-like stage. Modified cells were identified morphologically, phenotypically, and genotypically. For transfection of cells, were used nanosized polymer complexes with any sncRNAs. Selected polymer-sncRNAs complexes has some advantages, such as: long period of biodegradation (more than 40 days), early beginning of transfection changes of cells (7–10 days), minimal toxic effects in optimal concentrations range (experiments with mice), high transfection efficiency (90–97%) with minimal concentration of sncRNAs, possibility to sterilization.

**Korotkov D.A., Seurko K.I., Seurko K.I.***I.M. Sechenov First Moscow State Medical University*

2110821@mail.ru

**MOLECULAR ASPECTS OF BONE REMODELING**

Introduction. About 33.8% of women and 26.9% of men over 50 years suffer from osteoporosis in the Russian Federation (according to the Institute of Rheumatology of the Russian Academy of Sciences). Idiopathic postmenopausal or senile osteoporosis is most common (85% of cases), resulting in bone remodeling disorders. Therapy of osteoporosis requires a deep understanding of the basics of physiological regeneration of bone tissue. Purpose. Identification of the key links in the regulation of bone tissue remodeling. Materials and Methods. Analysis and systematization of literary sources. Results. It was revealed that sclerostin indirectly blocks the effects of bone morphogenetic proteins (BMPs) via the Wnt – signaling cellular pathway. In people with impaired formation of sclerostin, sclerosteosis develops (a pathological proliferation of the bony tissue of the facial skeleton). It is also known that the RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa – B ligand) – OPG (osteoprotegerin) – the cytokine system plays a key role in conjugation of the remodeling phases. Numerous cytokines and hormones stimulate or inhibit the effects of RANKL and OPG. Some interleukins, prostaglandins E and E2, TNF (tumor necrosis factor), M – CSF, GM – CSF (macrophage and granulocyte – macrophage colony – stimulating factors) are local factors of bone resorption; interferon gamma, transforming growth factor beta (TGF – beta) are local factors of bone osteogenesis. Several factors have been studied separately or together in a number of investigations in vivo and in vitro, but with conflicting results. Regulation of calcification of bones is actively studied. According to recent data, inorganic pyrophosphate can act as a calcification inhibitor. The inhibitory effect of pyrophosphate is eliminated by pyrophosphatase during mineralization, which is found in bone tissue. Conclusion. The recent scientific data on the regulation of bone tissue regeneration, that showed good results in clinical trials, made it possible to develop new directions in the therapy of osteoporosis: the use of antibodies to RANKL (Denosumab) and antibodies to sclerostin (Romosozumab).

**Kuvyrkov E.<sup>1</sup>, Skorb E.<sup>2</sup>, Ulasevich S.<sup>3</sup>, Brezhneva N.<sup>4</sup>, Kosmacheva S.M.<sup>1</sup>, Potapnev M.P.<sup>1</sup>, Belyasova N.A.<sup>5</sup>**<sup>1</sup> *Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies*<sup>2</sup> *Harvard University*<sup>3</sup> *Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus*<sup>4</sup> *Belarusian State University*<sup>5</sup> *Belarusian State Technological University*  
Evgeny.Kuvyrkov@blood.by**THE BIOMATERIAL SYSTEMS ON THE BASIS OF MESOPOROUS TITANIUM DIOXIDE COATINGS FOR A HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS STUDY**

Porous titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) coatings provide an ingrowth of bone-tissue extracellular matrix into a metal surface to improve an osteointegration between a bone and a metal [1–3]. Porous coatings can serve

for a surface delivery of biomolecules stimulating a cell behavior to accelerate an osteosynthesis on a metal surface [4, 5]. The surface nanotopography and the surface biomolecules encapsulation are inspired to create the lab-on-a-chip system and the bioconstruction on the basis of bone implant with a nanostructured TiO<sub>2</sub> coating and human stem cells and to culture tissues and organs in vitro [6]. Here, the aim of research is to investigate the surface nanotopography influence of the mesoporous coatings on the basis of TiO<sub>2</sub> on the viability and proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). We focus on the mesoporous nanostructures, a pore diameter 40-70 nm. The order TiO<sub>2</sub> nanotubes films (TNT) and the disorder mesoporous TiO<sub>2</sub> films (TMS) were obtained by the methods of electrochemical anodization and sonochemical treatment, respectively. The chemical deposition of nanoscale hydroxyapatite (HA) was applied to modify the surface of nanostructured TiO<sub>2</sub> films with remaining their nanotopography (HA-TNT, HA-TMS). The viability and proliferation of MSCs were evaluated via a MTT-test in 4 days of incubation after nonattached cells had removed in 24 hours. To visualize the MSCs upon the mesoporous films on the basis of TiO<sub>2</sub>, the method of confocal laser scanning microscopy was used. Our research showed the MSCs kept the viability upon the TNT, TMS, HA-TNT, HA-TMS during a cultivation. Moreover, a specific cell density was higher upon the TNT, TMS, HA-TNT, HA-TMS than upon the smooth surfaces of cultured plastic and initial titanium. The proliferation of MSCs was determined higher upon the order TNT and HA-TNT compared with the disorder TMS and HA-TMS. Thus, for a MSCs expansion, the films having a symmetry surface nanotopography are more favorable. The deposition of nanoscale HA allowed to increase a MSCs number on the TNT and TMS. In conclusion, we proved that the strategy of surface nanostructuring to guide the MSCs behavior on the TiO<sub>2</sub> was attractive to improve orthopaedic implants and a lab-on-a-chip system development.

#### References

1. J. Kopf et al. *Adv. Eng. Mater.*, 2016, 18, 476-483.
2. Y. Zhukova et al. *Ultrason. Sonochem.*, 2017, 36, 146-154.
3. Y. Zhukova et al. *Adv. Health. Mater.* 2017, DOI: 10.1002/adhm.201601244.
4. E. V. Skorb et al. *Adv. Mater.*, 2013, 36, 5029-5043.
5. D. V. Andreeva et al. *Small*, 2012, 8, 820-825.
6. Y. Zhukova et al. *Adv. Health. Mater.*, 2017, DOI: 10.1002/admi.201600282.

Acknowledgements: *State budget.*

**Litvin Y.<sup>1</sup>, Kovac M.<sup>2</sup>, Aliev R.<sup>2</sup>, Zakirova E.<sup>1</sup>, Rutland C.<sup>3</sup>, Kiyasov A.<sup>1</sup>, Rizvanov A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Kazan Federal University*

<sup>2</sup> *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology*

<sup>3</sup> *School of Veterinary Medicine and Science, Faculty of Medicine, University of Nottingham*  
litvin108@yandex.ru

#### **GENE THERAPY USING PLASMID DNA ENCODING VEGF164 AND FGF2 GENES FOR THE TREATMENT OF HORSE TENDINITIS AND DESMITIS: CASE REPORTS**

Tendon or ligament injuries are one of the most common causes of orthopedic disorders in horses (*Equus caballus*) of any age and breed. Injuries of the digital flexor tendons (superficial and deep digital flex-

ors) and the suspensory ligament are of utmost clinical importance in the horse resulting in more than 98% of all cases observed in practice. We have designed a plasmid DNA-based genetic construct (named pBUDK-ecVEGF164-ecFGF2) to restore damaged connective tissue of the tendon and ligament. Recombinant plasmid contains coding sequences of *Equus caballus* protein growth factors VEGF164 (also known as VEGFA164) and FGF2 (also known as bFGF). The generation of plasmid DNA pBUDK-ecVEGF164-ecFGF2 has been previously described in «doi:10.1007/s12668-016-0273-2». In this clinical study, for the first time we successfully used the direct gene therapy to restore severe injuries of the suspensory ligament branch and superficial digital flexor tendon in horses (*Equus caballus*). We injected the plasmid DNA encoding two therapeutic species-specific growth factors: vascular endothelial growth factor (VEGF164) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) at the site of injury in the suspensory ligament branch and tendon. Treatment effects were evaluated with the use of clinical observation and ultrasound imaging during a period of a few months. We showed that gene therapy used within a period of 2-3 months after the injury resulted in the complete recovery of functions and a full restoration of the severely damaged suspensory ligament and superficial digital flexor tendon.

**Lopatina T.<sup>1</sup>, Grange C.<sup>1</sup>, Cedrino M.<sup>1</sup>, Ranghino A.<sup>1</sup>, Favaro E.<sup>1</sup>, Fallo S.<sup>1</sup>, Tetta C.<sup>1,2</sup>, Camussi G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *University of Turin*

<sup>2</sup> *UNICYTE*

tatiana.lopatina@unito.it

#### **PDGF ENHANCES THE PRO-REGENERATIVE PROPERTIES OF EXTRACELLULAR VESICLES RELEASED FROM ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS**

**INTRODUCTION:** Adipose mesenchymal stem cells (ASCs) promote angiogenesis and tissue regeneration through paracrine mechanisms. We have previously shown that platelet derived growth factor (PDGF) stimulate ASCs to secret extracellular vesicles (PDGF-EVs) with a stronger pro-angiogenic potential than EVs secreted in basic conditions (EVs). The aim of the present study was to investigate the molecular mechanism involved in angiogenic, regenerative and immunomodulatory activity of PDGF-EVs. **METHODS:** For this purpose we studied in vitro the effects of PDGF-EVs on the secretion of inflammatory factors by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as well as their influence on PBMC adhesion on endothelial cells. EVs were used for comparison. In vivo we have also studied the effects of EVs and PDGF-EVs in an acute limb ischemia pre-clinical model. The molecular differences between EVs and PDGF-EVs were also investigated. **RESULTS:** In vivo results demonstrate that PDGF-EVs was significantly more effective in restoring large vessel reperfusion and muscle tissue regeneration. More of these, PDGF-EVs inhibited inflammatory cell recruitment in injured tissue, then EVs stimulate immune cell infiltration. In vitro control EVs but not PDGF-EVs enhanced PBMC adhesion on endothelium, confirming our in vivo results. In addition, PDGF-EVs were able to stimulate nitric oxide production in endothelium cells that could be implicated in PBMC adhesion. Direct stimulation of PBMC with control EVs induced secre-

tion of pro-inflammatory factors such as IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-17 and TNF- $\alpha$ . Whereas PDGF-EVs not only attenuated the secretion of pro-inflammatory factors, but also significantly enhanced the expression of TGF- $\beta$ 1, well-described anti-inflammatory factors, implicated in the differentiation of regulatory T cells. Indeed we have shown that stimulation of PBMC with PDGF-EVs increased the population of Treg in vitro. Proteomic analysis demonstrated differences in pro-angiogenic and pro-inflammatory protein content between PDGF-EVs and control EVs. In particular PDGF-EVs were enriched in HGF, TGF $\alpha/\beta$  and their receptors, IL-1 ra, VEGF, Tie, OSM, uPA, uPAR, MMPs, Thrombospondins, BDNF, ICAM, IGF. While bEVs carried high levels of CD80, G-CSF, GM-CSF and CD40/TNFRSF5. PDGF-EVs were also enriched in pro-regenerative microRNAs, such as miR-130a, miR-19a, miR-296, miR-17, miR-21, miR-92a, miR-34b, miR-520d, miR-377, miR-146b and long non-coding RNA such as MALAT1. **CONCLUSIONS:** This study demonstrates that PDGF stimulates ASCs to secrete EVs enriched in anti-inflammatory and pro-regenerative factors, which could account for PDGF-EV-mediated protection against ischemia reperfusion injury.

Acknowledgements: AIRC – *Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro UNICYTE*

**Maklygina Y.S.<sup>1</sup>, Sharova A.S.<sup>2</sup>, Balla V.K.<sup>3</sup>, Loschenov V.B.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> GPI RAS

<sup>2</sup> MEPhI

<sup>3</sup> CSIR-Central Glass and Ceramic Research Institute

us.samsonova@physics.msu.ru

#### **SPECTRAL LUMINESCENT PROPERTIES OF PHOTSENSITIZERS' NANOCRYSTALS AS HYDROXYAPATITE IMPLANT SURFACE COATING**

**Abstract** The spectral luminescent properties of developed by us coating for the hydroxyapatite implants were experimentally investigated in this study. Crystalline photosensitizer nanoparticles with photobactericidal properties were used as an implant coating. This research opens the prospect of such technology application in order to provide the local inflammatory and autoimmune reactions prevention in the area of implantation. Introduction Surgical intervention with subsequent implantation is a difficult process in terms of post-operative recovery, preventing of inflammatory responses and the implant rejection processes. Currently, the most promising methods for the bactericidal effect achievement in the area of implantation are physical methods, particularly antimicrobial photodynamic therapy. This method shows a pronounced photobactericidal activity and anti-inflammatory effect. Antimicrobial photodynamic therapy also prevents the dystrophic and sclerotic processes that can effectively reduce the risk of implant rejection and accelerate biointegration. Materials and methods The most perspective material, which is widely used in the field of clinical implantation our days, is hydroxyapatite. Hydroxyapatite is characterized by high stability, bioactivity and biocompatibility. The photosensitizers in nanoform are used as effective photobactericidal substances for implant coating, which do not exhibit their photodynamic activity in the absence of inflammatory agents. Meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin (Bch NPs) and non-sulfonated aluminum phthalocyanine (AIPhc NPs) were investigated as photosensitiz-

ers, that can provide the greatest penetration depth of photodynamic treatment. Test compounds have the absorption peak in the near infrared and red ranges, respectively. Such spectral medicines' features correspond to the maximum optical transparency region of biological tissues that considers Bch NPs and AIPhc NPs to be the most promising photosensitizers, especially in monitoring of pathological processes with deep localization. The luminescence spectra of Bch NPs and AIPhc NPs were examined with the use of a fiber spectrometer LESA-01-"BIOSPEC" (in the range of 0.4-1.1  $\mu$ m) in various conditions including the interaction with surface hydroxyapatite molecules. The excitation of nanoparticles was realized by laser radiation sources with power density of  $\sim 100$  mW/cm<sup>2</sup> and  $\lambda = 532$  nm, 632.8 nm wavelengths, selected in accordance with photosensitizers absorption spectra maximums. Results The analysis of the luminescence spectra dynamics for the both types of crystalline nanoparticles have shown that initially inphotoactive photosensitizers' nanocrystals acquire the ability to luminescence in interaction conditions with hydroxyapatite surface molecules. However, the luminescence peaks intensity varies over time under the influence of the exciting laser radiation. Conclusion The possibility of the nanoparticles activation on the surface of covered implant was proved during the study. The activity level of nanoparticles was estimated by the control of photoluminescence intensity. Based on the research it was concluded that the photosensitizers' nanoparticles interact both among themselves and with a complex porous structure of the implant. The findings of the study suggest this technology promising in order to create implants with photobactericidal properties.

**Poliakova M.V.**

*Center for Data – Intensive Biomedicine and Biotechnology of Skolkovo Institute of Science and Technology*  
marusiapoliakova@gmail.com

#### **HUMAN MALE GERM CELL DIFFERENTIATION FROM ADULT DERIVED INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS**

Human infertility affects 10–15% of the couples in world, and male factors account for about 50% of causes, which has become a severely medical issue. Reproductive stem cell loss begets from a variety of conditions including chemo- and radiotherapy, genetic and congenital disorders. Stem cell research is of great importance in treating male infertility. Assisted reproduction techniques with semen cryopreserved before the onset of gonadotoxic treatment has shown good fertility outcome. But this cannot help out prepubertal boys. Yet, these boys do have spermatogonial stem cells (SSCs) that able to produce sperm at the start of puberty, which allows them to safeguard their fertility through testicular cell suspensions or testicular tissue cryopreservation. Autologous SSC transplantation, testicular tissue grafting to the testis or to a heterotopic area and in vitro spermatogenesis have opened new possibilities to restore fertility in humans. However, these techniques are still at a research stage and their efficiency depends on the amount of SSCs available for fertility restoration. To this date, no clinical parameters are available to efficiently diagnose and detect patients who might benefit from these techniques. Retrieval of SSCs in prepubertal boys should

therefore still be viewed as experimental model. Studies on mouse models as well as human gene mutation have suggested a correlation between genetic causes (e.g. chromosomal aberrations and single gene mutation) and male infertility. For male infertility with a normal genetic background, stem cell therapy to generate male gametes may also represent a promising treatment strategy. Currently there are three major stem cell sources for generating male differentiated germ cells: the embryonic stem (ES) cells, the induced pluripotent stem (iPS) cells, and SSCs. Compared with human ES cells, iPS cells have some advantages: i) there is no ethical issue for using human iPS cells; ii) the source for obtaining human iPS cells is more abundant; and iii) male gametes derived from patients' own iPS cells have genetic information; iii) mature cells derived from patient iPS cells can be used for patient-specific cell therapy without immune rejection. Stem cells, by definition, have the potentials of both self-renewal and differentiation. Recent studies have reported that iPS cells from mice and humans can differentiate into primordial germ cells. The derivation of male germ cells from iPS cells constitutes both a desirable model for reproductive geneticists, and a potential method for treating patients with infertility due to germ cell defects. This will be provide a platform for exploring the molecular mechanisms underlying spermatogenesis and raises the possibility of using male germ cells derived from patient -derived iPS cells. Also the Sertoli cell-only syndrome patients without male germ cells might father own biological children using their iPS cells-derived male gametes for treat male infertility.

#### **Rochev Y.**

*Sechenov First Moscow State Medical University,  
Institute for Regenerative Medicine  
yury.rochev@nuigalway.ie*

#### **SMART POLYMERS FOR ADVANCED CELL TECHNOLOGY AND TISSUE ENGINEERING**

Over the last couple of decades a number of innovative approaches to manufacturing thin poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAm) based thermoresponsive coatings for advanced cell culture applications have been developed and refined. The development of reproducible and robust techniques for cell and cell sheet harvesting from the fabricated coatings provides a wide scope of opportunity in regenerative medicine. Unlike traditional cell culture detachment methods, detachment from thermoresponsive substrates allows for the detachment of cells without the disruption of cell-to-cell junctions. Therefore this approach can facilitate the harvesting of cell sheets, which can be applied for tissue engineering purposes. The main goal of this work is to answer the following key questions: "Why some pNIPAm surfaces are conducive to cell adhesion and proliferation while others are not? Why some pNIPAm surfaces are provide cell detachment while others are not?"

**EXPERIMENTAL METHODS.** The polymers used in this study are pNIPAm, NIPAm-co- N-tertbutylacrylamide (NtBAm) with different NIPAM content, NIPAm-co-acrylamidobenzophenone (AcBzPh), NIPAm-co-NtBAm-co-AcBzPh, NIPAM-poly-(ethylpyrrolidone methacrylate) (pEPM) with different NIPAM content, NIPAm -co- octadecyl methacrylate (ODMA). LCST range from 8°C to 36°C. Four film fabrication methods were investigated: physisorption deposition, solvent casting technique, spin coating film deposition and

UV-crosslinking. Film thickness varies within 10 nm–10 mkm. Film characterisation: Characterization of the prepared films was achieved using XPS, ESM, contact angle and AFM measurements.

**Cell culture:** The range of the cell culture lines, primary cells including tenocyte, mesenchymal stem cells and iPS cells have been used for cell detachment and cell sheet preparation. Cell proliferation and differentiation, gene expression, extracellular matrix synthesis and kinetics of cell sheet detachment have been analysed.

**RESULTS AND DISCUSSION.** In total we investigated 14 polymers and four film fabrication methods. pNIPAm coatings are generally poorly cell compatible and a number of complex or expensive techniques have been developed in order to overcome this issue. Results suggest that only nm –scale pNIPAm films are preferable for cell sheet fabrication. The control of pNIPAm film thickness using the spin-coating technique offers an effective tool for cell sheet-based tissue engineering. Also, we developed simple one- step method of film preparation for nonplanar surfaces. More hydrophobic NIPAm-co- NtBAM based films provide better cell growth, but hydrophobicity dramatically decreases cell detachment rate (>2 hours), which may be essential factor for cell culture operation. Copolymers NIPAM-EPM demonstrate highly cell compatibility.

**CONCLUSION.** New thermoresponsive polymers and methods of film deposition allow to obtain "smart" coatings with the desired physical characteristics, including surface energy, roughness etc., which in turn allows to control the kinetics of cell growth and detachment. A unique potential advantage of the physical adsorption method for preparing thermoresponsive coatings is that this approach could be used to coat materials with complicated geometric profiles, which may be useful for medical devices, microfluidic systems and tissue engineering.

*Acknowledgements: The work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 15-15-00132).*

#### **Sheard J.**

*University of Reading  
j.sheard@reading.ac.uk*

#### **THE USE OF NANOFIBRILLAR CELLULOSE HYDROGEL TOWARDS CULTURE EXPANSION AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MSCS**

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been found to be beneficial in many clinical studies. Currently, cultivation methods of MSCs are suboptimal. Adherent, two dimensional cultivation of MSCs does not reflect their natural niche, therefore resulting in an altered phenotype. Additionally, large quantities of cell culture medium and consumables are needed for the maintenance and expansion of MSCs. In this study, we cultivated MSCs within a 3D nanofibrillar cellulose (NFC) hydrogel. We hypothesized that this is a more effective method to culture and expand the MSCs, maintain their functionality and viability, while simultaneously lowering culture costs. After analysis of the pore size of the 3D NFC hydrogel, we were able to observe interactions of MSCs with the fibres using SEM and membrane stains. Moreover, we tested and confirmed viability of the cells within the NFC using live/dead staining as well as XTT assays. Finally, we showed that MSCs grown in 3D NFC hydrogel were able to differentiate along the osteogenic lineage, therefore

widening the potential application of this 3D matrix. In summary, we show that 3D NFC is biocompatible with human MSCs, and represents a feasible approach to upscaling their culture.

**Tetta C.<sup>1</sup>, Bruno S.<sup>2</sup>, Collino F.<sup>3</sup>, Lopatina T.<sup>2</sup>, Camussi G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Unicyte AG*

<sup>2</sup> *Turin University*

<sup>3</sup> *Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho*  
Ciro.Tetta@fmc-ag.com

#### **EFFECTS OF EXTRACELLULAR VESICLES IN REPAIR OF ACUTE AND CHRONIC RENAL INJURY**

Extracellular vesicles (EVs) appear as important actors in cell-to-cell communication. EV content is characterized by proteins and RNA species that dynamically reflect cell and tissue state. Urinary EVs in particular may act in inter-nephron communication with possible beneficial or detrimental effects. Increasing interest is addressed to the pharmacological properties of EVs as a cell-free therapy, since several of the effects attributed to stem cells have been recapitulated by administration of their EVs. Preclinical data in models of renal damage indicate a general regenerative potential of EVs derived from mesenchymal stromal cells of different sources including bone marrow, fetal tissues, urine and kidney. In my presentation, I will discuss the results on the effect of EVs in repair of acute and chronic renal injury, and the mechanisms involved. In addition, I will analyze the strategies for EV pharmacological applications in renal regenerative medicine as well as the limitations and benefits.

Acknowledgements: *Unicyte AG.*

**Widera D.**

*University of Reading, United Kingdom*

#### **EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS AS A NOVEL APPROACH TO STIMULATE BONE REGENERATION**

The bone has an intrinsic capacity to regenerate itself. However, if the lesion size or degree of degeneration is too severe to be regenerated via endogenous repair mechanisms, the use of stem cells provides an elegant and promising way to replace the lost tissue or to boost the organism's regenerative capacity. Importantly, several adult progenitor and stem cell types have been described to be able to generate bone cells. This includes osteoblast progenitor cells, mesenchymal stromal cells (MSCs) of different origin and adult neural crest-derived stem cells (NCSCs). Thus, all those cell type could be potentially applied to regenerate bone tissue after transplantation via engraftment, differentiation and functional integration. Notably, in addition to this direct contribution, stem cells like MSCs and NCSCs can contribute to tissue repair through secretion of paracrine factors that mediate anti-inflammation, immunomodulation and boost endogenous regeneration. This paracrine mode of action is nowadays widely believed to be at least partly mediated by a release of extracellular vesicles (EVs) with anti-inflammatory and immunomodulatory proteins and miRNA as their primary cargo. In this lecture, basic EV biology will be discussed in addition to specific application of NCSC-derived EV in bone regeneration in preclinical models.

**Witte F.**

*Julius Wolff Institute and Center for Musculoskeletal Surgery  
Center for Regenerative Therapies,  
Charité University Medicine Berlin*  
frank.witte@charite.de

#### **CURRENT STATUS ON CLINICAL APPLICATIONS OF MAGNESIUM-BASED ORTHOPAEDIC IMPLANTS: A REVIEW FROM CLINICAL TRANSLATIONAL PERSPECTIVE**

Orthopedic implants made of biodegradable magnesium alloy have been used in specific applications in clinical routine with considerable success and efficacy. However, the underlying mechanisms by which these implants improve bone healing and osteogenesis remain elusive. It could be shown that abundant new bone was formed in rats at peripheral cortical sites after the intramedullary implantation of a pin containing ultrapure magnesium into the intact distal femur. This response was accompanied by substantial increases of neuronal calcitonin gene-related polypeptide- $\alpha$  (CGRP) in both the peripheral cortex of the femur and in ipsilateral dorsal root ganglia. Surgical removal of the periosteum, capsaicin denervation of sensory nerves or knockdown *in vivo* of the CGRP-receptor-encoding genes *Calcr1* or *Ramp1* substantially reversed the magnesium-induced osteogenesis. Overexpression of these genes, however, enhanced magnesium-induced osteogenesis. An elevation of extracellular magnesium concentration induces also magnesium transporter 1 (MAGT1)-dependent and transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7 (TRPM7)-dependent magnesium entry. Also, an increase in intracellular adenosine triphosphate (ATP) and the accumulation of terminal synaptic vesicles in isolated rat dorsal root ganglia neurons could be observed. In isolated rat periosteum-derived stem cells, CGRP induces CALCRL- and RAMP1-dependent activation of cAMP-responsive element binding protein 1 (CREB1) and SP7 (also known as osterix), and thus enhances osteogenic differentiation of these stem cells. Taken together, these findings reveal a previously undefined role of magnesium in promoting CGRP-mediated osteogenic differentiation, which may explain the therapeutic potential of this ion in Regenerative Medicine.

**Абакушина Е.В.<sup>1</sup>, Денисенко М.В.<sup>2</sup>, Курцер М.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России*

<sup>2</sup> *ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»*

abakushina@mail.ru

#### **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ – НОВАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЯИЧНИКОВ**

Проблема сохранения фертильности пациенток с преждевременной недостаточностью яичников (ПНЯ) вследствие лечения онкологических заболеваний, оперативных вмешательств на яичниках, аутоиммунного воздействия или генетической пред-

расположенности весьма актуальна из-за возрастающего количества таких пациенток. В большинстве случаев сохранить свою репродуктивную функцию эти женщины могут с помощью методов ВРТ: криоконсервации ооцитов, эмбрионов, овариальной ткани. Выбор оптимальной стратегии индивидуален и зависит от множества факторов. Нами была проведена экспериментальная работа — культивирование ткани яичников *in vitro* — в условиях, в которых примордиальные фолликулы развивались и сохраняли свою жизнеспособность. В исследовании принимали участие 4 пациентки в возрасте от 18 до 40 лет со сниженным овариальным резервом различного генеза. При гистологическом исследовании кортикальный слой биоптатов яичников пациенток содержал кистозно-атрезирующиеся фолликулы, преантральные и антральные фолликулы обнаружены не были. Фрагменты овариальной ткани доставляли в лабораторию в день оперативного вмешательства в течение 2–3-х ч. в фосфатно-солевом буфере, измельчали скальпелем и выращивали на протяжении 34 дней в полной питательной среде RPMI-1640 с 10% FCS, эпидермальным фактором роста (EGF) и гормонами (инсулин, ФСГ). Каждый день проводили микроскопический анализ морфологии ткани яичников. Каждую неделю несколько фрагментов овариальной ткани подвергали окраске флуоресцентными красителями (PI, CAM, AlexaFluor 488 Annexin) для оценки жизнеспособности клеток и наличия апоптоза. Морфологический анализ показал наличие в образцах клеток гранулезы, фибробластов, атретических фолликулов в толще овариальной ткани. Со временем фибробласты сформировали монослой в некоторых лунках, клетки гранулезы в суспензии с 5–7 дня начинали активно пролиферировать, к 21 дню 20–30% клеток окрашивались на апоптоз, а к 34 дню процент мертвых клеток составил около 60%. На 10–14 дни культивирования были обнаружены фолликулы с антральной полостью или без неё. К 28 дню в лунках наблюдалось формирование отдельных фолликуло-подобных структур. Флуоресцентная микроскопия измельченных фрагментов ткани яичников показала хорошую выживаемость стромальных элементов на протяжении всего периода культивирования. При добавлении EGF и ФСГ сохранялись мелкие сосудистые образования. Показано, что жизнеспособность клеток ткани яичников при данных условиях культивирования сохраняется на протяжении 34 дней. Нами были получены фолликулы ранних стадий развития (преантральные и ранние антральные). Однако получить фолликулы, содержащие зрелые ооциты, не удалось. Требуются дополнительные исследования для выявления факторов, оказывающих воздействие на созревание примордиальных фолликулов у пациенток с ПНЯ.

**Абдрахманов А.А.<sup>1</sup>, Максимчик П.В.<sup>2</sup>, Гогвадзе В.Г.<sup>2,3</sup>, Животовский Б.Д.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,

<sup>3</sup> Каролинский институт, Отделение токсикологии, Факультет медицины окружающей среды alibek.aaa.94@gmail.com

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ТЕРАПИИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**

Онкологические заболевания — основной вызов для человечества в XXI веке. На сегодняшний день самым эффективным средством против опухолей является комбинированное лечение радиотерапией и химиотерапией. Обратной стороной медали является цитотоксическое воздействие на организм данных методов. Опухолевые клетки отличаются от нормальных рядом особенностей, таких как неограниченное деление, уход от надзора иммунной системы, изменение экспрессии генов, перестройка метаболизма. В данный момент особое внимание уделяется метаболизму опухолевых клеток, который в значительной степени отличается от метаболизма нормальных. Еще с 20-х годов прошлого века Отто Варбургом было показано, что большинство опухолевых клеток даже в аэробных условиях используют гликолиз для снабжения клеток АТФ. При этом, активность митохондрий существенно снижена. Варбург полагал, что в основе развития опухоли лежит повреждение митохондрий, которые являются основным энергетическим компартментом клеток. В последнее время в противоопухолевой терапии в качестве мишени рассматривают именно электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) митохондрий. Ингибирование различных комплексов этой цепи с помощью разных агентов способно вызывать образование активных форм кислорода (АФК), запускающих каскады реакций, приводящих к гибели клеток. Одним из таких агентов является теноилтрифторацетон (ТТФА) — ингибитор комплекса II (сукцинатдегидрогеназы) ЭТЦ. ТТФА взаимодействует с убихинон-связывающим участком субъединицы D сукцинатдегидрогеназы. В результате этого электроны, поступающие в комплекс в результате окисления сукцината, не передаются на убихинон, а высвобождаются из комплекса с образованием супероксидадикала. Поскольку большинство опухолей развивается в условиях гипоксии, целью данной работы было выявить, как в клетках нейроblastомы человека ингибирование дыхательной цепи с помощью ТТФА способно стимулировать гибель клеток в нормоксических и гипоксических условиях. В ходе работы были получены следующие результаты.

1) Добавление ТТФА, в комбинации с ДНК-повреждающим агентом — цисплатином, к клеткам нейроblastомы человека TET21N и SK-N-BE(2) значительно стимулирует клеточную гибель в условиях нормоксии, в то время как в гипоксических условиях клеточная гибель снижается.

2) ТТФА вызывает эндоплазматический стресс в клетках TET21N.

3) При совместном воздействии ТТФА с цисплатином, уровень АФК увеличивается.

4) Базальный уровень АФК при гипоксии выше, чем при нормоксии.

Таким образом, комбинирование препаратов, адресно действующих на митохондрии, с химиотерапией способно значительно повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Финансирование исследования: *грант РНФ 14-25-00056.*

**Аверьянов А.В., Королева И.А.,  
Конопляников М.А.**

*Федеральный научно-клинический центр  
ФМБА России  
ФГБУ «НИИ пульмонологии ФМБА России»  
averyanovav@mail.ru*

**КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ  
ЛЕЧЕНИЯ АЛЛОГЕННЫМИ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ  
КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ  
БЫСТРОПРОГРЕССИРУЮЩИМИ ФОРМАМИ  
ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА**

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) — редкое хроническое прогрессирующее заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся замещением паренхимы легких соединительной тканью, приводящее к развитию тяжелой дыхательной недостаточности. Как показали исследования последних лет традиционное лечение этого заболевания кортикостероидными или цитостатическими препаратами малоэффективно и приводит к развитию многочисленных осложнений. Современные антифиброзные препараты хотя и уменьшают скорость прогрессирования заболевания, но в силу их высокой стоимости практически недоступны для пациентов. В многочисленных экспериментальных исследованиях была показана эффективность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по сдерживанию развития фиброза легких. Целью нашего пилотного клинического исследования, проведенного в 2013–2016 гг., была оценка безопасности и эффективности терапии МСК костного мозга у пациентов с быстрым прогрессированием ИЛФ.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование были включены 20 пациентов, 12 мужчин, 8 женщин в возрасте от 49 до 72 лет с подтвержденным диагнозом идиопатического легочного фиброза со снижением жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) или коэффициента диффузии (DLCO) более чем на 10% за 12 мес., предшествующих включению. Пациенты были рандомизированы в 2 группы по 10 пациентов в каждой, одна из которых в течение 1 года каждые 3 мес. получала 2 внутривенных инфузии суспензии донорских мезенхимальных стволовых клеток костного мозга по 200 млн клеток в каждой, а вторая внутривенные инфузии метилпреднизолона 125 мг в том же режиме. Оценивались нежелательные побочные явления и динамика функциональных и рентгенологических проявлений интерстициальных изменений в легких.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В течение исследования умерло 4 пациента от прогрессирования дыхательной недостаточности (по 2 из каждой группы). Из остальных больных в группе терапии МСК у двух пациентов наблюдалось дальнейшее прогрессирование заболевания, четверо демонстрировали стабильность функциональных показателей, а у оставшихся двоих в течение 12 мес. наблюдалось увеличение ФЖЕЛ до 27% и DLCO до 49%. В группе, получавшей ме-

тилпреднизолон, у всех выживших пациентов наблюдалось дальнейшее прогрессирование процесса и падение легочной функции. При компьютерной томографии высоких разрешений у выживших пациентов через 12 мес. лечения МСК не установлено существенной динамики признаков интерстициального поражения. Из нежелательных побочных эффектов у 50% больных, получавших МСК, зафиксированы головокружения, чувство жара, субфебрильная лихорадка в день проведения инфузий.

**ВЫВОДЫ.** Терапия аллогенными МСК костного мозга пациентам с быстро прогрессирующим течением ИЛФ в заявленных режимах продемонстрировала отсутствие серьезных нежелательных побочных эффектов и умеренную функциональную и клиническую эффективность без значимых изменений рентгенологических проявлений интерстициального процесса в легких.

**Айдарова В.С., Бабийчук Г.А.**

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины  
aidarova@karazin.ua*

**КРИОКОНСЕРВИРОВАННАЯ ПУПОВИННАЯ  
КРОВЬ СПОСОБСТВУЕТ ИЗМЕНЕНИЮ  
СТРУКТУРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС  
ЛИНИИ SHR**

Объектом исследования были две группы 12-мес. спонтанно гипертензивных крыс линии SHR, являющихся удачной моделью для изучения нейродегенеративных заболеваний. Контролем была I группа крыс, II группе внутривенно одноразово вводили криоконсервированные ядросодержащие клетки пуповинной крови (rЯСК ПК). Препараты головного мозга (ГМ) окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофусином по Ван-Гизону, толуидиновым синим по Нисслю. Морфометрически определяли значение нейронального индекса, плотность нейронов и глиоцитов в 1 мм<sup>2</sup> V слоя коры ГМ на микроскопе OlympusBX-41 с использованием программ OlympusDP-Soft (Version 3:1) и MicrosoftExcel. Микроскопически в препаратах ГМ крыс обеих групп в артериальных сосудах мягких мозговых оболочек и ГМ обнаруживались морфологические изменения, характерные для артериальной гипертензии: гипертрофия и гиперплазия гладких миоцитов, межмышечный склероз в артериях мышечного типа, плазматическое пропитывание и гиалиноз стенки артериол. У крыс I группы в некоторых артериальных сосудах белого вещества и подкорковых образований наблюдался очаговый или тотальный фибриноидный некроз стенки с развитием диапедезных или более крупных кровоизлияний разной степени давности. Во II группе признаков острой деструкции сосудов и свежих геморагий не выявлялось. Структурные изменения сосудов обуславливают развитие хронической ишемии вещества головного мозга, что в обеих исследуемых группах морфологически проявлялось дегенеративными изменениями нейронов в виде деформации и гиперхромии, образованием клеток-«теней» с их распадом и нейронофагией; образованием очагов разряжения и запустения нейронами вещества мозга с реактивным глиозом и формированием глиальных узелков. В I группе во всех наблюдениях обнаруженные дегенеративные изменения нейронов носили распространенный характер с выраженным обеднением нервными клетками всех



слоев коры и подкорковых образований и развитием диффузно-очагового глиоза. Плотность нейронов по I группе составила  $1115,94 \pm 50,58$  экз/мм<sup>2</sup>, плотность глиоцитов –  $1839,65 \pm 87,19$  экз/мм<sup>2</sup>, значение нейроглиального индекса –  $1,65 \pm 0,05$ . Во II группе нейронная популяция неоднородна – наряду с нейронами обычного строения встречались группы клеток с дегенеративными изменениями. В 50% наблюдений кора ГМ и подкорковые образования с относительно равномерным распределением нейронов, в остальных случаях в них обнаруживались локусы ганглиозноклеточных разрежений и очаги повышенной плотности нейронов. В целом во II группе плотность нейронов ( $1300,31 \pm 61,76$  экз/мм<sup>2</sup>) и значение нейроглиального индекса ( $1,14 \pm 0,03$ ) достоверно превышали соответствующие показатели в I группе ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ ), а плотность глиоцитов ( $1476,82 \pm 74,29$  экз/мм<sup>2</sup>) достоверно уменьшалась ( $p < 0,001$ ). Т.о. у крыс SHR в коре и подкорковых образованиях ГМ обнаруживаются морфологические признаки альтернативных изменений нейронной популяции с развитием реактивного глиоза, выраженность которых при введении КЯСК ПК значительно снижается.

Финансирование исследования. *Бюджетное финансирование темы НИР Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.*

**Акасов Р.А.<sup>1</sup>, Лео М.В.<sup>2</sup>, Буров С.В.<sup>2</sup>, Марквичева Е.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова*

<sup>2</sup> *Институт высокомолекулярных соединений РАН*

<sup>3</sup> *Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*  
roman.akasov@gmail.com

### **RGD-ЗАВИСИМАЯ АГРЕГАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Поддержание высокой выживаемости трансплантируемых клеток, а также обеспечение их правильного фенотипа и дифференцировки является одной из важных задач тканевой инженерии. Ранее было показано, что культивирование нормальных клеток в мультিকлеточных сфероидов способствует выживаемости клеток и сохранению их фенотипа. По сравнению с монослойными культурами, клетки в сфероидов также имеют повышенный регенеративный потенциал (Cesarzetal, 2016). При этом сфероиды можно рассматривать как строительные блоки для восстановления ткани, которые можно имплантировать как отдельно, так и в составе биодеградируемого полимерного матрикса. К настоящему времени разработано несколько способов формирования сфероидов, но все они обладают недостатками, в частности, трудоемкостью и малым количеством получаемых сфероидов. Ранее нами был разработан новый метод формирования сфероидов из опухолевых клеток с использованием циклических RGD-пептидов (Akasovetal, 2016). Целью настоящего исследования являлась разработка простого и универсального RGD-зависимого способа получения сфероидов из первичных культур нормальных клеток. Для работы в качестве модельных клеток использовали фибробласты, выделенные из кожи человека и мезенхимальные стволовые клетки (МСК),

полученные из жировой ткани. Клетки помещали в 96-луночный планшет (10,000 клеток на лунку) и добавляли циклический RGD-пептид непосредственно к монослойной культуре клеток в концентрации 1–100 мкМ. Было показано, что через 48–72 ч. клетки агрегировали с образованием сфероидов при концентрации пептида в интервалах 10–100 мкМ и 25–100 мкМ, соответственно. Меньшая концентрация, необходимая для формирования сфероидов из МСК, может свидетельствовать о различиях в уровнях экспрессии интегринов и/или гликозилирования, как это было показано нами ранее (Haqetal, 2017). При этом средние размеры полученных сфероидов были  $56 \pm 13$  мкм для МСК и  $50 \pm 10$  мкм для фибробластов. Высокая выживаемость клеток в сфероидов была подтверждена флуоресцентным тестом «живой-мертвый». Интересно, что удаление пептида из среды приводило к адгезии клеток к поверхности планшета в течение 24 ч. Также сфероиды включали в коллагеновый гель (95% коллагена I), имитирующий условия in vivo. При этом было обнаружено, что сфероиды в отсутствие RGD-пептида распадались на отдельные клетки, которые заселяли гель в течение 3–5 дней. Таким образом, был разработан новый метод получения сфероидов из нормальных клеток с помощью RGD-агрегации и показана обратимость процесса. Разработанные подходы можно использовать в качестве новой стратегии в тканевой инженерии, в том числе для заселения полимерных биодеградируемых матриксов.

#### *Литература:*

1. Cesarz Z. and Tamama K. Stem Cells Int. 2016. 2016:9176357.

2. Akasov R, Zaytseva-Zotova D, Burov S, Leko M, Dontenwill M, Chiper M, Vandamme T, Markvicheva E. Int. J. Pharm. 2016. 506(1–2): 148–157.

3. Haq S., Haxho F., Samuel V., Akasov R., Leko M., Burov S., Markvicheva E., Szewczuk M Onco Targets Ther. 2017 10:2427-2447.

**Габбасова Л.А.<sup>1</sup>, Койлю А.А.<sup>2</sup>, Сурина Е.Р.<sup>3</sup>, Маилян М.С.<sup>4</sup>, Тарасова Е.В.<sup>1</sup>, Акоюн Ж.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>2</sup> *Министерство здравоохранения Российской Федерации*

<sup>3</sup> *Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>4</sup> *Философский факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*  
lgabbasova@mail.ru

### **БИОМЕДИЦИНА И ПРАВО. ВОПРОСЫ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ ДОНОРСТВА ОРГАНОВ (ТКАНЕЙ) ЧЕЛОВЕКА И ИХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Согласие является краеугольным камнем всех медицинских вмешательств и в первую очередь с позиции соблюдения прав человека. Наиболее актуален этот вопрос для области биомедицины, которая развивается неимоверно стремительными темпами, а успехи порой противоречивы. Таким образом, важно упорядочить достижения медицины и биологии, расставив их по степени риска. К числу таких обсуждаемых тем относятся вопросы правового регулирования донорства органов, тканей, клеток.

«Руководящие принципы ВОЗ по трансплантации человеческих клеток, тканей и органов» (1987

г., ред. 2010 г.) оказали влияние на организацию и правовое регулирование процессов донорства органов и их трансплантации в более чем 60 странах Европы. Документ гласит, что «в зависимости от социальных, медицинских, культурных традиций каждой страны . . . , согласие на получение органов и тканей от умерших может быть «четко выраженным» (презумпция несогласия) или «предполагаемым» (презумпция согласия)».

В случае выражения согласия (или не согласия) информация о волеизъявлении вносится в национальные регистры, базы данных, доступ к которым имеют только специалисты, принимающие участие в каждом конкретном случае донорства и трансплантации органов. В ряде стран, например, во Франции, в регистр волеизъявлений собирают информацию только о несогласии на изъятие органов после смерти в целях трансплантации, в случае отсутствия такого волеизъявления в базе данных вступает в силу «презумпция согласия». В таких странах как Италия, Испания, которые являются лидерами в отношении донорства и трансплантации в Европе, законодательство основано на принципе «презумпции согласия». В то же время, в этих странах существует высокий уровень информированности граждан о донорстве органов, тканей и их трансплантации. На протяжении 20 лет при активном участии публичных деятелей, в том числе представителей католической церкви, через средства массовой информации формировалось общественное мнение о важности и значимости донорства органов и тканей в целях трансплантации.

В ряде стран, например, в США, информацию о согласии гражданина на донорство органов после смерти, внесенную в Национальный регистр волеизъявлений, дублируют в документах, подтверждающих личность гражданина или водительских правах. К такому решению они идут десятилетиями и для этих стран более характерно законодательство, в основе которого лежит «презумпция несогласия» (испрошенное согласие). Отметка в документе гражданина о донорстве органов, говорит о позитивном отношении к этой процедуре и является отражением сложившегося общественного мнения в отношении донорства органов.

Разнообразие подходов в вопросах получения и регистрации волеизъявления, связанного с донорством органов, тканей, клеток в различных странах связано с тем, что за определение порядка получения и регистрации согласия отвечают национальные органы власти. В то же время, в основе правового регулирования этой процедуры лежат единые, общепринятые международными актами, положения.

Финансирование исследования. *Выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Акимов М.Г., Ашба А.М., Грецкая Н.М.,  
Безуглов В.В.**

*Институт биоорганической химии РАН  
akimovmike@yandex.ru*

### **N-АЦИЛДОФАМИНЫ – РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

N-Ацилдофамины (NADA) – конъюгаты дофамина и жирных кислот, чаще всего ненасыщенных. Эти вещества относятся к семействам эндоканнабиноидов и эндованилоидов. Они образуются в организме

как млекопитающих, так и более примитивных организмов и участвуют во многих процессах регуляции в организме и клетке. К известным мишеням NADA относятся GPCR CB1, CB2, не-CB1/CB2, ионный канал TRPV1 а также ряд других белков (дофаминовый рецептор, кальциевые и калиевые каналы). Участие NADA в процессах регенерации тканей практически не изучено. Цель данной работы – изучение действия NADA и их производных на пролиферацию и дифференцировку клеток в условиях длительного обращения, а также выяснение соответствующих механизмов. Поскольку большая часть известных эффектов NADA реализуется в рамках нервной системы, мы использовали в качестве модели линии клеток феохромоцитомы PC12, глиомы C6 и нейробластомы NT-22. Для каждой линии для набора NADA были определены LC50, после чего культуры инкубировали с разными концентрациями веществ две недели. Гибель клеток и её характер обнаруживали с помощью МТТ и LDH тестов, по активности каспаз и окрашиванию аннексином. Степень дифференцировки определяли по длине и числу отростков и по экспрессии мРНК ряда маркеров стволовых клеток, астроцитов, зрелых нейронов и их предшественников. Молекулярные мишени NADA и пути передачи сигнала внутри клетки определяли с помощью селективных ингибиторов, репортерных систем и нокдауна мРНК. Для NADA с остатками арахидоновой, олеиновой и докозагексаеновой кислот, а также амидов арахидоновой кислоты с тирамином и норадреналином в диапазоне 2–30 мкМ наблюдали 50% гибель клеток, а увеличение времени инкубации не приводило к возрастанию числа погибших клеток. Напротив, вещества в концентрации ниже 1 мкМ стимулировали пролиферацию, а в диапазоне от 1 мкМ до LC50 индуцировали рост отростков и сдвиг в сторону экспрессии нейрональных маркеров у PC12 и астроцитарных у C6. Для клеток NT-22 была зафиксирована только гибель. Молекулярной мишенью NADA на клетках PC12 был рецептор GPR55, который передавал сигнал через PLC, IP3R и кальций на CaMKIV и затем на фактор транскрипции CREB, который запускал экспрессию NO синтазы и, предположительно, секрецию IL-6; предполагается, что IL-6 обеспечивает запуск дифференцировки через путь JAK/STAT. Таким образом, на модели крысиных глиомы C6 и феохромоцитомы PC12 нам впервые удалось показать, что низкие концентрации N-ацилдофаминов (до 1 мкМ) стимулируют пролиферацию, промежуточные (1–20 мкМ) индуцируют дифференцировку, а более высокие ведут к апоптозу, опосредованному активацией специфического рецептора. Не исключено, что NADA могут быть одним из важных факторов в регенерации тканей после повреждений. Работа частично поддержана грантом РФФИ 16-04-00729а.

Финансирование исследования. *Работа частично поддержана грантом РФФИ 16-04-00729а.*



**ЦЕЛЬ.** Разработать протоколы подготовки матриксной и клеточной составляющих для создания модели тканеинженерной конструкции (на модели кожи свиньи).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальными животными были 3 поросят-самок породы Ландрас (возраст 8 недель, 13–15 кг). После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы толщиной 0,3; 0,5; 0,7 мм. В качестве источника ММСК использовали подкожно-жировую клетчатку, взятую на глубине 0,12; 0,24; 0,36 мм. Образцы многократно промывали в растворе Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) для удаления примеси крови и доставляли в лабораторию. Культивировали при стандартных условиях: 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, абсолютная влажность. Ростовая среда: DMEM (Gibco, США), антибиотики (100 Ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин), 2% глутамин и 20% ТЭС (Gibco, США). Для индукции дифференцировки ММСК 3 пассажа использовали набор HumanMesenchymalStemCellFunctionalIdentificationKit (RandDsystems, USA). В качестве специфических красителей: для липидных вакуолей — OilRed (Sigma, USA), для солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты — ализариновый красный; хондрогенную дифференцировку оценивали с помощью иммуногистохимического исследования (антитела S-100, Sigma, USA). Фенотип ММСК свиньи определяли с помощью антител CD 44 FITC, CD 90 PerCP-Cy5.5, CD 10 Pe-Cy7, CD 45 PE на цитометре BDFACSCANTOII. Децеллюляризацию образцов кожи проводили детергент-энзиматическим методом с использованием 4% дезоксихолата натрия, 0,9% TritonX-100, 0,1 М раствора гидроксида натрия и бычьей панкреатической ДНКазы в течение 8 циклов. Оценку качества децеллюляризации проводили рутинными гистологическими методами и путем количественного определения резидуальной ДНК.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Оптимальный выход клеток фиксировали из слоя 0,24 мм. Через 24 ч. отмечали адгезию клеток к пластику, через 72 ч. меняли среду. К 6 – 10 дню формировался субконфлюэнтный монослой (60%), и культуры пересевали. Клетки имели фибробластоподобную морфологию, хорошо распластывались, дифференцировались в трех направлениях. Фенотип клеток характерен для ММСК (CD 90+, CD 44+, CD 10+, CD 45-). Клетки, выделенные из жировой ткани свиньи, обладают характеристиками ММСК и могут использоваться для рецеллюляризации тканеинженерных конструкций и изучения их свойств в доклинических исследованиях. Волокна внеклеточного матрикса кожи после децеллюляризации были сохранены, клеточные элементы отсутствовали. Содержание остаточной ДНК несколько превышало допустимое и составило 62%, что требует доработки протоколов децеллюляризации.

**Александрова Л.В.<sup>1</sup>, Шумеев А.Н.<sup>1,2</sup>, Золина Т.Л.<sup>1</sup>, Котова А.В.<sup>1,3</sup>, Иволгин Д.А.<sup>1,4,5</sup>, Адылов Ш.Ф.<sup>1</sup>, Енукашвили Н.И.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ООО «Покровский Банк Стволовых Клеток»

<sup>2</sup> Зоологический институт РАН

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>4</sup> Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова

<sup>5</sup> НИЛ Клеточных технологий

lyudaal@yandex.ru

### **МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПУПЧОНОГО КАНАТИКА: СОХРАННОСТЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПОРТИРОВКЕ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Клиническое применение недифференцированных мезенхимных стволовых клеток (МСК) — одно из ключевых направлений современной регенеративной терапии. Для достижения максимального эффекта необходимо, чтобы клиника и лабораторный комплекс располагались в одном здании и время транспортировки материала было минимальным. Чаще получается так, что лаборатория и конечный потребитель находятся в разных городах, иногда на значительном удалении. В таком случае требуется длительная транспортировка материала. Цель исследования — изучение жизнеспособности МСК после длительного хранения в без криоконсервации различных условиях и выявление оптимального способа транспортировки — при комнатной температуре (22±2°C), при +4°C. Оценивали жизнеспособность клеток при хранении в физиологическом растворе, фосфатно-солевом буфере (ФСБ), 2 и 10% растворах альбумина в физиологическом растворе. Все эти растворы часто используются при транспортировке клеток без криоконсервации. ФСБ используется в качестве стандартного раствора для манипуляций с клетками, физиологический раствор и растворы альбумина являются препаратами, разрешенными к медицинскому применению. Для исследования мы использовали паспортизированную культуру МСК 0715-365, полученную из периваскулярного пространства пупочного канатика человека. Клетки культивировали до 5 пассажа в состоянии гипоксии, после этого собирали для исследования и разводили до необходимой концентрации (3×10<sup>5</sup> клеток/мл) в различных транспортных средах. Анализ жизнеспособности проводился на проточном цитометре с помощью окраски 7-аминоактиномицином Д (7-AAD). Жизнеспособность клеток в ФСБ после 24 ч хранения при комнатной температуре падает с 90±1.8% до 83.3±0.5%, в физиологическом растворе с 89.6±3.5% до 84.1±0.4%, в растворе альбумина 10% с 86.1±1.7% до 48.4±2.7%, что связано с его гиперосмотичностью. При хранении при +4°C наблюдается схожая картина: жизнеспособность изменяется в ФСБ от 79.7±1.2% до 78.2±2.5%, в физиологическом растворе от 80.8±1.8% до 78.3±1.3%, в 10% альбумине от 73.6±1.2% до 23.0±4.6%. При использовании 2% альбумина темп падения жизнеспособности не меняется, что соответствует наблюдениям из литературных источников (Lane, 2009; Chen, 2013). Таким образом, можно сделать вывод, что длительное хранение (до 24 ч.) МСК при комнатной температуре при использовании физиологического раствора не снижает статистически значимо жизнеспособность клеток

и может использоваться при транспортировке биомедицинского клеточного продукта, включающего в себя живые клетки.

Финансирование исследования. *Работа выполнена в рамках НИР «Исследование морфо-функциональных свойств мезенхимных стволовых клеток при длительном культивировании in vitro» при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01163.*

**Александрова О.И.<sup>1</sup>, Хорольская Ю.И.<sup>1</sup>,  
Околов И.Н.<sup>2</sup>, Дубовиков А.С.<sup>3</sup>, Безушко А.В.<sup>3</sup>,  
Чурашов С.В.<sup>3</sup>, Черныш В.Ф.<sup>3</sup>, Панова И.Е.<sup>2</sup>,  
Блинова М.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский филиал ФГБУ  
«МНТК «Микрохирургия глаза» им.  
акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

<sup>3</sup> Военно-медицинская академия  
им. С.М. Кирова МО РФ

elga.aleks@gmail.com

### **ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ**

Спектр разработок биомедицинских клеточных технологий (КТ) широк – от генной, клеточной, тканевой, органной терапии и инженерии до биологического скрининга in vitro. КТ прочно входят в повседневную медицинскую практику, находя применение в различных областях медицины, в том числе и в офтальмологии. Одним из самых важных элементов зрительного аппарата является роговица глаза. Она легко вовлекается в патологический процесс и медленно выходит из него. Повреждения роговицы вызывают нарушения её функций, что является одной из главных причин частичной или полной утраты зрения. Ткани глаза после повреждений могут восстанавливаться только в ограниченном объеме. Наиболее перспективным методом, позволяющим влиять на ход репарации роговицы, рассматривают трансплантацию культивируемых стволовых клеток. В научном мире идет активный поиск источников стволовых клеток и материалов для создания клеточно-тканевых конструкций искусственной роговицы. Применение в экспериментах in vivo для лечения лимбальной недостаточности у кролика разработанных нами скаффолдов на основе коллагена и амниотической мембраны, заселённых лимбальными стволовыми клетками, показало себя эффективным и возможным для дальнейшего использования в клинике. Не менее важной задачей клинической офтальмологии является сохранение структуры и функций роговицы при лекарственной терапии. Локальное применение препаратов в конъюнктивальную полость непосредственно воздействует на эпителий роговицы и конъюнктивы, оказывая влияние на скорость репарации этих тканей. Исследования влияния применяемых в клинической практике офтальмологических препаратов на жизнеспособность клеток тканей глаза в условиях in vitro, могут способствовать правильному подбору глазных капель при комплексной терапии глазной патологии, сводя к минимуму риск реализации цитотоксических эффектов. Проведенные нами исследования токсичности глазных капель различных фармакологических групп с использованием модельных тест-систем на основе клеток роговицы и конъюнктивы человека выявили различия в цитотоксическом потенциале этих препаратов и показали принципиальную воз-

можность использования клеточных тест-систем для рациональной фармакотерапии глазных патологий. В настоящее время для целого ряда офтальмологических патологий не существует оптимальных патогенетически обусловленных методов лечения, что приводит к низкой эффективности терапии и росту инвалидизации пациентов. Использование КТ в офтальмологии позволяет осуществить прорыв в этой области.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 14-50-00068.*

**Александрюшкина Н.А.<sup>1</sup>, Макаревич О.А.<sup>1</sup>,  
Нимирицкий П.П.<sup>1</sup>, Данилова Н.В.<sup>2</sup>,  
Ефименко А.Ю.<sup>1</sup>, Еремичев Р.Ю.<sup>1</sup>,  
Макаревич П.И.<sup>1</sup>, Парфенова Е.В.<sup>3,4</sup>,  
Ткачук В.А.<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины  
МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Медицинский научно-образовательный центр  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский  
центр кардиологии

<sup>4</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

n.alexandrushkina@gmail.com

### **КЛЕТОЧНЫЕ ПЛАСТЫ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЫЗЫВАЮТ ЗАЖИВЛЕНИЕ ГЛУБОКОГО ДЕФЕКТА МЯГКИХ ТКАНЕЙ У КРЫСЫ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Лечение ран и восстановление объемных дефектов тканей – серьезная медицинская задача, для решения которой современные методы часто оказываются недостаточно эффективными, что приводит к инвалидизации пациентов. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время активно применяются для восстановления поврежденных тканей благодаря их репаративному потенциалу и простоте получения. Тканеинженерные технологии, такие как создание клеточных пластов (КП), могут иметь существенные преимущества для заживления ран вследствие более высокой жизнеспособности клеток, наличия в их составе нативных белков матрикса и активных факторов роста.

**ЦЕЛЬ.** Сравнить эффективность заживления глубоких ран у крысы под влиянием МСК жировой ткани, трансплантированных в виде суспензии и в составе КП.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** МСК были выделены из подкожной жировой клетчатки самцов крыс Wistar. У наркотизированных животных иссекали кожно-фасциальный лоскут, подкожный жир и создавали дефект трапециевидных мышц спины. С целью предотвращения естественной раневой контракции края раны фиксировали к внутреннему краю латексного кольца. Трансплантацию МСК осуществляли путем микроинъекций в дно раны (1,5 млн клеток в 1 мл фосфатно-солевого буфера, 5 микроинъекций по 200 мкл), либо путем аппликации КП после его открепления с культурального пластика (площадь лунки 9 см<sup>2</sup>, количество клеток в начальный момент сборки – 450 тыс., культивирование в течение 7 сут.). В группе отрицательного контроля животные не получали специфического лечения. Заживление ран оценивали по скорости закрытия раневого дефекта, динамики изменения площадей грануляционной ткани и зоны фиброза при гистологических

исследованиях, а также по плотности сосудов на срезах биоптатов со дна раны.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Полученные КП представляли собой многослойную конструкцию толщиной до 30 мкм, имели в своем составе коллаген I типа, ламинин, фибронектин. Трансплантация МСК значительно ускорила заживление ран по сравнению с контролем, причем использование КП показало большую эффективность по сравнению с использованием МСК в суспензии. Закрытие дефекта в группе КП наблюдалось к 28-му дню после операции, в группе применения суспензии клеток — к 35-му дню и в группе контроля — после 49-го дня проведения эксперимента. Морфометрический анализ гистологических образцов показал более ранние сроки образования и созревания грануляционной ткани, активный ангиогенез и быстрый переход к формированию коллагеновых депозитов и фиброзированию после трансплантации МСК.

**ВЫВОДЫ.** В модели глубокой шинированной раны мягких тканей крысы доставка КП из МСК продемонстрировала высокую эффективность в восстановлении тканей по сравнению с отрицательным контролем и применением клеток в суспензии, выражающуюся в сокращении сроков созревания грануляционной ткани, отложения коллагена и закрытия раневого дефекта. Полученные результаты позволяют рассматривать этот подход как перспективный метод заживления ран.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-04-01452 (исследования in vitro), грантом РНФ № 16-45-03007 (работа с животными) и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Алексеева О.Ю.<sup>1,2</sup>, Самчук Д.П.<sup>2</sup>,  
Шапвалов Р.С.<sup>3</sup>, Кудинов В.А.<sup>2</sup>,  
Сапрыкин В.П.<sup>4</sup>, Лаук-Дубицкий С.Е.<sup>4</sup>,  
Самчук П.М.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

<sup>3</sup> Филиал ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Вересаева» ДЗ г. Москвы

<sup>4</sup> ГНЦ Федеральный медицинский биофизический цнгр им. А.И. Бурназяна ФМБА России

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)  
alekseeva.olgay@gmail.com

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОДХОДОВ К ВЫДЕЛЕНИЮ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ИЗ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Одно из основных направлений регенеративной медицины — клеточная терапия, в котором преобладают мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Среди всех источников МСК перинатальные ткани имеют ряд существенных преимуществ: неинвазивность, минимальные этические проблемы при получении биологического материала, промежуточное положение между пренатальными и постнатальными клетками, значительный пролиферативный и дифференцировочный потенциал. Однако протоколы выделения перинатальных МСК варьируют между исследовательскими группами. В то же время

сравнительное описание эффективности подходов к выделению МСК изучено слабо.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ:** Проведение сравнительного экспериментального анализа подходов к выделению клеточных линий из перинатальных источников.

**МЕТОДЫ.** После получения информированного согласия, из плаценты (n = 3) после планового кесарева сечения забирались несколько участков и помещались в 50 мл транспортной среды с антибиотиками и антимикотиком. Материал доставлялся в лабораторию в течение 4 ч. Амниотическая мембрана (AM), сегмент пуповины, децидуа 5 мм толщиной и базальная пластинка хориона механически измельчались. Объем раствора фермента к объему ткани составлял 1:1 по 5 мл, инкубация проходила в термостате при 37°C с интенсивным перемешиванием каждые 15 минут. Применяли 0,15% коллагеназу (Sigma, C6885), трипсин 0,25% и 0,125% (STEMCELL, 07901). Сравнили разделение амниотических эпителиальных (АЭК) и мезенхимальных клеток (АМК) с предварительной 30 мин. выдержкой в 0,25% и 0,125% растворе трипсина, с последующей выдержкой в течение 1–2 ч. в коллагеназе. МСК хориона и пуповины выделялись путем выдержки в коллагеназе в течение 2 ч., с/без предварительной обработки в 0,25% трипсине 30 мин. Децидуа разделялась в коллагеназе 1–2 ч. Клетки высаживали на культуральный флакон 25 см<sup>2</sup> с добавлением DMEM/F12+20% FBS. Анализ проводили в 4 случайно выбранных полях зрения (1 мм<sup>2</sup> каждое) с применением микроскопа (Zeiss, AxioObserver.A1) под увеличением ×100. Дополнительно проведена гистологическая окраска AM гематоксилин-эозином.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** АЭК отделяются от AM при обработке трипсином 0,125% (8–10 кл/пз) и 0,25% (15–20 кл/пз). Последующее использование коллагеназы приводило к выделению АМК (2–4 кл/пз) с примесью АЭК в первом случае; во втором, напротив, АМК отсутствовали во флаконе, а также и в AM, что подтверждалось гистологически. AM разрушалась за 1–1.5 ч. Децидуа распадалась за 1 ч. (2–5 кл/пз) и 2 ч. (0 кл в пз). Инкубация в коллагеназе сопровождалась выделением МСК пуповины вне зависимости от предобработки трипсином (30–40 кл/пз), МСК хориона, напротив, наблюдались только после предобработки трипсином (11–18 кл/пз).

**ВЫВОДЫ.** Множество факторов оказывают влияние на время обработки, количество клеток, их жизнеспособность. Проводятся дальнейшие исследования для разработки наиболее эффективных протоколов выделения клеточных линий из перинатальных источников.

**Алексеев Л.Л.<sup>1</sup>, Виноградов А.Е.<sup>1</sup>,  
Анацкая О.В.<sup>1</sup>, Шилина М.А.<sup>1</sup>,  
Корниенко Ю.С.<sup>2</sup>, Гринчук Т.М.<sup>1</sup>,  
Никольский Н.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
al.l.l@mail.ru

**МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ  
ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА,  
СИНХРОНИЗИРОВАННЫЕ В ФАЗЕ G0/G1  
КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, МЕНЕЕ ВОСПРИИМЧИВЫ  
К СУБЛЕТАЛЬНОМУ ТЕПЛОВОМУ  
ВОЗДЕЙСТВИЮ, ЧЕМ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ  
КЛЕТКИ**

Уникальность стволовых клеток взрослого организма позволяет им дифференцироваться в различные типы клеток, мигрировать в поврежденные ткани, и оказывать на них паракринное воздействие за счёт секреции противовоспалительных факторов. Это открывает широкие перспективы использования мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) в регенеративной медицине. В живом организме стволовые клетки могут в течение длительного периода оставаться в состоянии покоя и начинают пролиферировать только в ответ на локальные сигналы повреждения. Трансплантация клеточного продукта требует значительной биомассы МСК, достигаемой при помощи их культивирования. Таким образом, большинство стволовых клеток, применяемых для трансплантации, находятся в пролиферирующем состоянии. В наших исследованиях мы сравнили реакцию на стресс покоящихся и пролиферирующих МСК. Мезенхимальные клетки эндометрия человека (эМСК) были использованы в качестве взрослых стволовых клеток. эМСК были синхронизированы в фазе G0/G1 клеточного цикла при помощи сывороточного голодания в течение 30 ч. Клеточная пролиферация инициировалась добавлением стандартной культуральной среды. Асинхронные клетки поддерживали в стандартных условиях культивирования. В качестве стрессового фактора использовали сублетальный (45°C, 30 мин.) тепловой шок (СТШ). Прогрев синхронизированных клеток проводили через 2 часа после запуска пролиферации, когда большинство клеток находилось в фазе G0/G1. Реакцию эМСК на тепловой шок оценивали по пролиферативной активности клеток, повреждению ДНК, изменению экспрессии генов стрессового ответа и клеточному старению. Было обнаружено, что клетки в фазе G0/G1 менее восприимчивы к стрессовым воздействиям. Асинхронные и синхронизированные клетки, пережившие СТШ, продолжали культивироваться в течение 6 пассажей после прогрева. Биоинформатический анализ транскриптома показал, что потомки всех клеточных вариантов, переживших СТШ, сохраняют высокую пролиферативную и дифференцирующую активность и не подвергаются трансформации. В то же время, синхронизированные клетки по энергетическому обмену, репарации, регуляции клеточного цикла, экспрессии маркеров старения и защите от онкогенеза более сходны с непрогретыми клеткам, чем асинхронные клетки. Результаты данного исследования показали, что накопление клеток в G0/G1 фазе клеточного цикла является простым решением для повышения выживаемости и сохранения функциональной активности мезенхимных

стволовых клеток, необходимых для их успешного использования в клеточной терапии.

Финансирование исследования: *Российский научный фонд (проект 14-50-00068)*.

**Анацкая О.В., Шилина М.А., Виноградов А.Е.,  
Алексеев Л.Л., Фридлянская И.И.,  
Гринчук Т.М., Никольский Н.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
olga.anatskaya@gmail.com

**ПУТИ ЗАЩИТЫ ОТ ТРАНСФОРМАЦИИ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ, ВЫЗВАННОЙ  
СУБЛЕТАЛЬНЫМ ТЕПЛОВЫМ ШОКОМ**

Целью работы было исследовать ответ мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека на сублетальный тепловой шок (СТШ) и выяснить, может ли СТШ вызвать генетическую нестабильность и трансформацию. После СТШ многие клетки подвергались стресс-индуцированному старению (СИПС). Изменения генома были оценены в клетках, избежавших СИПС на 6 пассаже после СТШ методом классического кариотипирования и транскриптомного анализа. Кариотипирование выявило хромосомную нестабильность и анеуплоидию. Результаты транскриптомного анализа подтвердили высокую генетическую нестабильность, которая оказывает глобальный эффект на активность транскриптома. Оценка критериев трансформации Ханахана – Вайнберга не выявила признаков малигнизации. Это предполагает, что СТШ-пережившие клетки обладают особенной системой защиты. Подробное исследование функционального распределения генных модулей обнаружало несколько линий защиты. Первую линию обеспечивает отсутствие экспрессии онкогенов MYC и AKT1 (PKB) и теломеразы hTERT. Вторая линия основана на способности эМСК снижать активность множества про-онкогенных путей в ответ на повреждение ДНК и анеуплоидию. Третью линию поддерживает координированная индукция противоопухолевых путей, включая TP53, p21 (CDKN1A) и p16 (CDKN2A), а также и путей репарации ДНК. Сопоставление наших данных с данными по изменению активности транскриптома в hTERT трансформированных МСК костного мозга человека показало, что СТШ-пережившие клетки отличаются повышенной способностью к дифференцировке, и адгезии и пониженной активностью ряда онкогенных путей. В целом, наши данные показывают, что, несмотря на генетическую нестабильность, СТШ-пережившие клетки не трансформируются, а подвергаются репликативному старению, подтверждая их онкологическую безопасность.

Финансирование исследования: *грант РНФ № 14-50-00068*.

**Новомлинский В.В., Глухов А.А.,  
Андреев А.А.**

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный  
медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»  
Минздрава России  
sugery@mail.ru*

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС  
ПРИ ОСТЕОМИЕЛИТЕ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ  
ГЛИЦЕРОСОЛЬВАТА ТИТАНА И ЛАЗЕРНЫХ  
ТЕХНОЛОГИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – улучшение результатов лечения хронического остеомиелита путем применения аквакомплекса глицеросольвата титана (АГТ) и низкоинтенсивного лазерного излучения (НЛИ). Исследования проведены на 175 белых крысах с хроническим остеомиелитом в 5 группах исследования: 2-х контрольных и 3-х опытных. Каждая группа включала 35 животных. 1-ю контрольную группу составили животные без лечения. Во 2-й контрольной и опытных группах проводилась хирургическая санация гнойного очага, которая в 1-й опытной группе была дополнена введением в костную полость АГТ; во 2-й опытной – ее обработкой НЛИ; в 3-й опытной – сочетанием применения НЛИ и АГТ. Динамику окислительного стресса оценивали по уровню малонового диальдегида /МДА/ и содержанию карбонильных групп в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином /ДНФГ/. Уровень МДА на 7-е сутки в 1-й контрольной группе составил  $43,12 \pm 4,17$  нмоль/л, что достоверно не отличалось от данных 2-й контрольной группы. Уровень МДА в 1-й опытной группе был равен  $34,02 \pm 2,73$ , во 2-й опытной –  $33,85 \pm 2,35$ , в 3-й опытной –  $28,47 \pm 3,05$  нмоль/л. Наиболее высокие показатели ДНФГ к 7-м суткам наблюдались в 1-й и 2-й контрольных группах –  $80,97 \pm 3,22$  и  $77,33 \pm 2,23$  нм/мг белка, соответственно. Изучаемый показатель в 1-й и 2-й опытных группах составил  $66,01 \pm 3,14$  и  $64,05 \pm 2,35$  нм/мг белка, соответственно. В 3-й опытной группе уровень ДНФГ равнялся  $58,44 \pm 3,28$  нм/мг, что было достоверно ниже по сравнению с контрольными группами. К 28-м суткам исследования в 1-й контрольной группе уровень МДА составил  $40,01 \pm 3,26$  нмоль/л. В опытных группах наблюдалось статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение изучаемого показателя, которое составило: в 1-й опытной группе –  $20,06 \pm 1,63$ , во 2-й опытной –  $17,90 \pm 1,20$ , в 3-й опытной –  $15,97 \pm 1,65$  нмоль/л. На 28-е сутки исследования в 1-й контрольной группе содержание ДНФГ было равно  $78,02 \pm 2,15$ , во 2-й контрольной –  $65,11 \pm 2,72$  нм/мг белка. В опытных группах изучаемый показатель был достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в контрольных группах и составил: в 1-й опытной группе –  $55,94 \pm 2,72$ , во 2-й опытной –  $53,58 \pm 2,13$ , в 3-й опытной –  $50,24 \pm 2,44$  нм/мг белка. К 60-м суткам исследования уровень МДА в 1-й контрольной группе был равен  $39,28 \pm 4,65$ , во 2-й контрольной –  $36,91 \pm 3,12$  нмоль/л. В 1-й, 2-й и 3-й опытных группах изучаемый показатель составил  $17,97 \pm 1,54$ ,  $17,01 \pm 0,92$  и  $14,86 \pm 1,93$  нмоль/л, соответственно, что практически соответствовало его уровню у интактных животных. К 60-м суткам в 1-й контрольной группе сохранялся высокий уровень ДНФГ ( $77,07 \pm 1,93$  нм/мг белка). Во 2-й контрольной группе произошло его достоверное снижение до  $59,61 \pm 2,04$  нм/мг. Уровень ДНФГ в 1-й, 2-й и 3-й опытных группах составил

$50,64 \pm 2,18$ ,  $50,07 \pm 1,66$  и  $48,59 \pm 1,99$  нм/мг, соответственно.

**ВЫВОДЫ.** Включение лазерных технологий и глицеросольвата титана в комплекс лечения хронического остеомиелита позволяет нормализовать показатели свободнорадикального окисления, приводит к стабилизации метаболических и купированию воспалительных процессов.

**Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.**

*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических  
проблем РАН  
andreeva\_er@mail.ru*

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
И МОНОЦИТ-ПРОИЗВОДНЫХ МАКРОФАГОВ:  
ПОЛЯРИЗАЦИЯ ФЕНОТИПА И ГИПОКСИЯ**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) и макрофаги (МФ) – клеточные элементы, которые могут быть обнаружены практически во всех тканях в организме. МСК представляют пул стромальных предшественников разной степени коммитированности, а макрофаги являются высокоспециализированными мононуклеарными фагоцитами, при этом общим для них является высокая пластичность, обеспечивающая их участие в физиологической и репаративной перестройке тканей. Адаптация МФ и МСК к микроокружению приводит к дивергенции их фенотипа, поляриными формами которой в зависимости от уровня провоспалительных медиаторов являются провоспалительные М1-МФ/МСК1, и противовоспалительные М2-МФ/МСК2. Особое внимание привлекают взаимные эффекты МСК и МФ, оркестрирующее формирующее микроокружение. В результате взаимодействия с МСК МФ приобретают МСК-обученный фенотип, сходный, но не идентичный с противовоспалительному М2. Возможно, что именно эти отличия могут специфицировать вовлечение МСК-обученных МФ в репаративное ремоделирование при повреждении тканей. В свою очередь, МФ-ассоциированные МСК демонстрируют провоспалительный МСК1-подобный фенотип с высокой миграционной и секреторной активностью. Таким образом, взаимодействие МСК и макрофагов обеспечивает реципрокное регулирование функциональной активности двух типов клеток. МСК стимулируют формирование МСК-обученного фенотипа МФ, сходного с противовоспалительным М2. МФ, в свою очередь, активируют промигранционную активность МСК, обеспечивая их вовлечение в репаративный процесс. Острый гипоксический стресс, возникающий в участках повреждения тканей наряду с депривацией нутриентов и увеличением концентрации провоспалительных медиаторов, создает ту специфическую нишу, в которой происходит взаимодействие клеток и реализация их функциональной активности. Активация как NF-зависимых и независимых (NF- $\kappa$ B) сигнальных путей индуцирует изменения, сопровождающиеся формированием специфического гипоксия-зависимого фенотипа МФ и МСК. Исходя из классической схемы развития воспаления и гипоксия-индуцированных изменений фенотипа МСК и МФ можно предложить гипотетическую схему их взаимодействия на фоне острого гипоксического стресса. МФ в таких условиях обладают свойствами классических М1-МФ, т.е это клетки с повышенной провоспалительной активностью.



тельной активностью, что востребовано на ранних этапах воспалительной реакции. При этом активация МСК в условиях гипоксического стресса приводит к изменениям, сходным с МФ-ассоциированным фенотипом, который обеспечивает способность МСК модулировать фенотип МФ в направлении противовоспалительного M2, необходимого для последующих фаз воспалительной реакции, а также самим МСК активно в этом участвовать за счет повышения миграции и продукции цитокинов, таких как VEGF, CCL-2, IL-6. Дальнейший анализ взаимодействия МСК и МФ в условиях острой гипоксии необходим для понимания механизмов регуляции физиологического и репаративного ремоделирования, а также выявления возможных терапевтических мишеней для коррекции нарушений тканевого ремоделирования, ведущего к хронизации патологических процессов.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ 17-04-00942.*

**Андреева Н.В., Гарбуз Д.Г., Евгеньев М.Б.,  
Белявский А.В.**

*Институт молекулярной биологии им.*

*В.А. Энгельгардта*

*muha-05@bk.ru*

#### **ВЛИЯНИЕ БЕЛКА HSP70 И ФИБРОНЕКТИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Регенерация тканей и органов при различных повреждениях происходит в основном за счет стволовых клеток организма. Как показали исследования последних десятилетий, в процессе старения происходит снижение, как количества стволовых клеток, так и их функции [1]. Это, по-видимому, является основным фактором, приводящим к нарушению функций тканей и органов при старении, а впоследствии и к смерти организма. С целью изучения возможности замедления старения клеток, проводятся эксперименты по культивированию клеток на разных подложках [2] и исследованию влияния некоторых белков на рост клеток, к примеру, таких, как белок теплового шока HSP70. Белок HSP70 отвечает за защитные функции организма при воздействии стрессовых условий окружающей среды. Также было отмечено, что компоненты внеклеточного матрикса (ECM), продуцируемые клетками, создают более естественную среду, чем культуральный пластик. Одним из наиболее важных и изученных белков ECM является фибронектин [3]. В настоящей работе мы оценивали влияние рекомбинантного человеческого HSP70 на рост молодых и старых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) мыши. Полученные данные показали, что HSP70 в концентрациях 2 мкг/мл и выше стимулирует рост старых, но не молодых МСК мыши. Подобный стимулирующий эффект на рост старых МСК также наблюдался при воздействии слабого теплового шока (42°C, 5 мин.) [4]. Кроме того, мы изучали рост клеток на фибронектине, фиксированном формальдегидом. Чашки покрывали фибронектином в концентрации 50 мкг/мл, фиксировали различными концентрациями формальдегида и культивировали МСК и другие клетки в условиях гипоксии (5% O<sub>2</sub>) и нормоксии. Наиболее высокая степень стимуляции роста МСК на фибронектине была достигнута при его фиксации 0.4–0.6% формальдегидом [5], при этом ускорение пролиферации было существенно выше для старых клеток по сравнению с молодыми.

В то же время стимулирующего эффекта фибронектина на иммортализованные клеточные линии не наблюдалось. Таким образом, контролируемая фиксация фибронектина формальдегидом представляет собой эффективный способ улучшения условий культивирования МСК. Также можно отметить, что введение белка HSP70 и умеренный тепловой шок приводят к определенному эффекту омоложения МСК.

#### *Литература:*

1. Signer RA, Morrison SJ. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell* 2013, V. 12, P. 152–165.

2. E Cukierman, Pankov, DR, Stevens, KM, Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension, *Science* 2001, V. 294, P. 1708-1712.

3. EH. Danen, KM. Yamada, Fibronectin, integrins, and growth control, *J. Cell. Physiol.* 2001, V. 189, P. 1-13.

4. NV Andreeva, OG Zatssepina, DG Garbuz, MB Evgen'ev, AV Belyavsky. Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells. *Cell Stress and Chaperones.* 2016, V. 21, P. 727-733.

5. Andreeva NV, Leonova OG, Popenko VI, Belyavsky AV. Controlled formaldehyde fixation of fibronectin layers for expansion of mesenchymal stem cells. *Analytical Biochemistry.* 2016, V. 514, P. 38-41.

Финансирование исследования: *РФФИ, грант № 14-50-00060.*

**Антакова Л.Н., Андреев А.А., Карапатьян А.Р.,  
Чуян А.О.**

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный  
медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»*

*Минздрава России*

*tsvn@bk.ru*

#### **ОЦЕНКА ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАСТВОРОВ С РАЗНОЙ КИСЛОТНОСТЬЮ ДЛЯ ОБРАБОТКИ РАНЕВЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ**

Наиболее распространенным осложнением процесса ранозаживления является раневая инфекция, доля которой в структуре хирургической заболеваемости составляет 35–40%. Инфекции кожи и мягких тканей составляют 70% первичной обращаемости к общему хирургу. Несмотря на значительное количество подходов в лечении ран мягких тканей, продолжается поиск эффективных методов стимуляции репаративных процессов. Целью исследования явилось улучшение результатов лечения ран мягких тканей в эксперименте путем применения кислотомодифицированных растворов. Исследование проведено на 75 самцах белых беспородных крыс, которые были разделены на 5 групп исследований (1-я контрольная и 4 опытных) по 15 особей в каждой группе. В каждой группе исследование проводилось моделирование ран мягких тканей по разработанной оригинальной методике с последующей ежедневной обработкой кислотомодифицированным раствором. В 1-й контрольной группе исследования обработка ран проводилась водой для инъекций (рН – 7,2). В 1-й опытной группе исследования раны обрабатывались 0,9% раствором NaCl (рН – 5,5). Во 2-й опытной группе исследования обработка ран осуществлялась 0,9% раствором NaCl (рН – 7,0). В 3-й опытной группе исследования раны обрабатывались 0,9% раствором NaCl (рН – 7,5). В 4-й опытной группе исследования обработка ран проводилась 0,05% водным раствором хлоргексидина (рН – 5,5). Динамическую рН-метрию раневого дефекта проводили с помощью стационарного рН-метра МИ-150 с элек-

тродом для микроколичеств субстрата. Забор крови для биохимических исследований производили на 1, 3, 5 и 7 сут. Биохимические анализы проводили с использованием сыворотки крови, полученной стандартным методом. В процессе исследования определяли уровень показателей оксидативного статуса (ОС): малоновый диальдегид (МДА), супероксиддисмутаза (СОД) и SH-группы. Исследования проводили в день забора биоматериала на биохимическом анализаторе ClimaMC-15. Статистическую обработку данных проводили с использованием MSOfficeExcel. При биохимическом исследовании параметров ОС было выявлено, что концентрация SH-групп в I фазе раневого процесса в 1-й опытной группе исследования составила  $80,27 \pm 1,3$  мг%, в то время как в 1-й контрольной, 2-й и 3-й опытных группах уровень сульфгидрильных групп держался на уровне не менее  $95,21 \pm 2,14$  мг%. У животных 1-й опытной группы исследования во II фазе раневого процесса концентрация МДА составила  $11,53 \pm 1,27$  нМ/л, по сравнению с 1-й контрольной, 2-й и 3-й опытной группами, где определялась концентрация МДА не ниже  $14,59 \pm 0,82$  нМ/л. Концентрация СОД в фазе регенерации у животных 1-ой контрольной группы исследования достигала уровня  $0,591 \pm 0,064$  Ед/мл, в опытных же группах исследования величина данного параметра не превышала  $0,357 \pm 0,062$  Ед/мл. Применение кислотомодифицированных растворов во II фазе раневого процесса стимулирует факторы антиоксидантной системы, способствует ускорению эпителизации дефекта.

Финансирование исследования: *Министерство здравоохранения в рамках выполнения государственного задания.*

**Антакова Л.Н., Киселева Е.А., Андреев А.А., Борискин Н.В.**

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России  
tsvn@bk.ru*

#### **ПОСТРЕЗЕКЦИОННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОМ ВВЕДЕНИИ ЦИАНОКОБАЛАМИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ**

Резекция печени является операцией выбора при первичных и вторичных злокачественных новообразованиях печени, некоторых доброкачественных образованиях, паразитарных кистах, циррозе, а также выполняется с целью забора фрагмента печени у живых доноров. Основным послеоперационным осложнением с высоким риском летального исхода является пострезекционная печеночная недостаточность (ППН). Ведущую роль в этиологии ППН занимает недостаточность регенераторных процессов в паренхиме печени. В связи с этим поиск и разработка методов стимулирования регенерации резецированной печени является приоритетной проблемой. Известно, что цианокобаламин (витамин В12) участвует в обмене жиров и нуклеиновых кислот, аминокислот, синтезе ацетилхолина и обладает свойствами супероксиддисмутаза. Большие дозы этого препарата (1000 мкг) оказывают обезболивающее действие. В связи с этим, целью исследования явилось изучение влияния внутрипеченочного введения цианокобаламина на пострезекционные процессы регенерации печени в эксперименте на крысах. Эксперимент

проводили на 3-х группах по 9 лабораторных животных — беспородных белых крысах, половозрелых самцах (1 — резекция печени (РП); 2 — РП и пункции паренхимы печени; 3 — РП и инъекции цианокобаламина в паренхиму печени). Всем животным осуществляли анатомическую резекции в объеме 70%. Животных вводили в хлороформный наркоз. В качестве хирургического доступа использовался косой подреберный разрез от верхушки мечевидного отростка до свободного края 11 ребра. Мобилизацию удаляемых долей (левой и медиальной) осуществляли пересечением венозной связки. Предварительно выделенную сосудистую ножку перевязывали прошивной лигатурой. Мобилизованные доли отсекали выше уровня наложенной лигатуры. Во 2-й группе непосредственно после резекции интраоперационно производили пункции паренхимы сохранённых долей печени глубиной 2–3 мм на расстоянии 5–7 мм друг от друга инсулиновыми иглами. В 3-й группе непосредственно после резекции интраоперационно в паренхиме сохранённых долей печени производили 10 инъекций инсулиновыми шприцами на глубину 2–3 мм на расстоянии 5–7 мм друг от друга по 0,1 мл витамина В12 в концентрации 200 мкг/мл. Ушивание раны осуществляли послойно: мышцы простым обвивным швом, кожа — узловым. В качестве шовного материала на всех этапах использовалась полигидроксиацетиловая нить 4/0. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 7-е и 14-е сут. после операции. Взвешивали массу регенерировавших сохранённых долей, производили забор крови и гистологического материала (паренхимы печени). Оценка регенерации проводилась посредством расчёта отношения наблюдаемой массы к исходной массе. Был проведен биохимический анализ крови и антиоксидантного статуса. Обработка полученных данных производилась в программе RStudio. Линейный дисперсионный показал позитивное значимое влияние цианокобаламина на пострезекционные процессы регенерации печени в эксперименте на крысах и более высокий свободный коэффициент (0,204), в целом характеризующий процесс восстановления.

Финансирование исследования: *Министерство здравоохранения в рамках выполнения государственного задания*

**Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Миронов А.В., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Барбараш Л.С.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
antonova.la@mail.ru*

#### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИМПЛАНТАЦИИ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ БИОФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ**

ВВЕДЕНИЕ. Создание биodeградируемых сосудистых графтов, способных стимулировать селективную адгезию эндотелиальных клеток и формирование новообразованной сосудистой ткани на своей основе — возможный путь решения отсутствия на рынке сосудистых протезов малого диаметра. Цель исследования — оценка ремоделирования *in vivo* сосудистой

ткани на основе сосудистых графтов, изготовленных из полигидроксibuтирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL), с комплексом сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF/основной фактор роста фибробластов bFGF/хемоаттрактантная молекула SDF-1 $\alpha$  (GFmix) или RGD-пептидами (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Графты PHBV/PCL/GFmix  $\varnothing = 2$  мм изготовлены методом двухфазного электроспиннинга с введением VEGF во внутреннюю 1/3 стенки, bFGF и SDF-1 $\alpha$  — во внешние 2/3 стенки матриксов. Графты PHBV/PCL изготавливали методом электроспиннинга и модифицировали RGD-пептидами по методике Sedaghati T. с соавт. (2014). Образцы графтов изучали методом сканирующей электронной микроскопии и имплантировали в брюшную часть аорты крыс (всего  $n = 32$ ; на точку  $n = 4$ ). Вывод животных из эксперимента — через 1, 3, 6, 12 мес. Эксплантированные графты окрашивали гематоксилином-эозином, на  $\alpha$ -актин, фактор фон Виллебранда (vWF), CD31, CD34, коллагены I и IV типов, DAPI.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Графты состояли их хаотично расположенных волокон, имели взаимосвязанные поры. В PHBV/PCL/GFmix выявлено больше наноразмерных нитей. Через 1 месяц имплантации 100% PHBV/PCL/GFmix и 75% PHBV/PCL/RGD были проходимы. Спустя 3 мес. проходимость всех графтов составила 75%. Через 12 мес. процент проходимых PHBV/PCL/RGD остался прежним, а PHBV/PCL/GFmix — повысился до 100%. Стенка графтов была инфильтрирована фибробластами, макрофагами и многоядерными клетками инородных тел. Через 3 мес. имплантации и до конца эксперимента на внутренней поверхности всех графтов выявлен монослой зрелых эндотелиальных клеток CD31<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup>. Коллаген IV типа расположен на внутренней поверхности графтов, I типа — в толще стенки и наружной капсуле. Гладкомышечный слой раньше формировался в PHBV/PCL/GFmix.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Модификация сосудистых графтов PHBV/PCL/GFmix или RGD одинаково эффективно способствовала их полной эндотелизации. Высокая проходимость графтов PHBV/PCL/GFmix могла быть обусловлена большей схожестью архитектуры их поверхности с естественным внеклеточным матриксом и более выраженным влиянием GFmix на жизнеспособность и функциональную активность эндотелиоцитов.

**Финансирование исследования:** *Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» за счет двух источников финансирования: 1) в рамках основного научного направления ФГБНУ НИИ КПССЗ «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов» (рег. № АААА-А16-116011910160-5 от 19.01.2016.); 2) за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050).*

**Арутюнян И.В.<sup>1</sup>, Тенчурин Т.Х.<sup>2</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>2</sup>, Коршунов А.А.<sup>1</sup>, Фатхудинов Т.Х.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

labrosta@yandex.ru

### **РАЗРАБОТКА БИОАРТИФИЦИАЛЬНОЙ СТЕНКИ ВЛАГАЛИЩА: IN VITRO СТАДИЯ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Хирургический кольпопозз выполняют при врожденной аплазии влагалища и матки (синдроме Майера — Рокитанского — Кюстера), пациенткам с травматическим повреждением влагалища или удалением органа в результате онкологических заболеваний. Используемые в настоящее время методы кольпопозза являются травматичными, обладают высоким риском возникновения осложнений в послеоперационном периоде и не всегда сопровождаются выраженным и продолжительным эффектом.

**ЦЕЛЬ.** Получение тканеинженерной конструкции на основе волокнистого поликапролактонового носителя и аутогенных эпителиальных и стромальных клеток для создания искусственного влагалища.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Четыре варианта биорезорбируемых нетканых материалов на основе поликапролактона, отличающиеся диаметром пор и волокон, были получены методом электроформования. Морфологию поверхности материалов изучали с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа, механические свойства определяли с использованием разрывной машины. Размер пор образцов определяли методом точки пузырька, пористость определяли по соотношению объема, занимаемого волокнами, и объема всего материала. Культуры клеток получали из биоптатов стенки влагалища женщин репродуктивного возраста методом эксплантов. Цитотоксичность материалов оценивали с помощью МТТ-теста и методом прямого контакта (окрашивание кальцеином AM и иодидом пропидия). Эффективность статического, динамического и капиллярного методов заселения носителей мечеными клетками оценивали по равномерности распределения клеток по поверхности и толще материалов (в том числе на поперечных криосрезах) с использованием электронной, флуоресцентной и темнопольной микроскопии, МТТ-теста.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Эпителиальные клетки, выделенные из биопсийного материала стенки влагалища, экспрессировали ЕрСAM и p63 (маркер базального слоя эпителия), стромальные клетки экспрессировали виментин (маркер клеток мезенхимального происхождения) и гладкомышечный актин. Поликапролактоновый носитель не был цитотоксичен, а по своим физико-механическим свойствам оказался близок децеллюляризованному матриксу ткани. Эффективность заселения носителей клетками зависела от их пространственных характеристик — толщины материала и диаметра пор, определяемых условиями электроформования материала. Для заселения стромальными клетками всей толщи выбранного образца носителя использовали капиллярный метод, для заселения эпителиальными клетками влагалища поверхностного слоя конструкции — статичный метод. После заселения стромальные клетки были

равномерно распределены в матриксе толщиной 1,5 мм; эпителиальные клетки располагались плотным пластом на внутренней поверхности конструкции, погружаясь на глубину  $88,9 \pm 32,5$  мкм.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученная тканеинженерная конструкция близка по своей архитектонике и клеточному составу нативному влагалищу. Развитие клеточных технологий, материаловедения и тканевой инженерии делает возможным создание биосовместимых искусственных органов человека и прорыв в области регенеративной медицины.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00281).*

#### **Асатурова А.В.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им.В.И. Кулакова» Минздрава России  
a.asaturova@gmail.com*

#### **ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТЧНОГО СОСТАВА МАЗКОВ МАТОЧНОЙ ТРУБЫ ПРИ ИНТРАЗПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПРЕДРАКОВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ**

**ЦЕЛЬ.** Определить возможность диагностики доброкачественных и предраковых поражений эпителия маточной трубы цитологическим методом с помощью сопоставления особенностей цитологических мазков жидкостной цитологии и гистологических препаратов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследованы 23 маточные трубы от 14 пациенток с серозной карциномой яичника высокой степени злокачественности (СКЯВСЗ) ( $n = 6$ ), серозными пограничными опухолями яичника (СПОЯ) ( $n = 7$ ), доброкачественными опухолями яичника ( $n = 10$ ) (средний возраст  $47,3 \pm 13,3$  лет) методом жидкостной цитологии, гистологическим, иммуноцитохимическим (ИЦХ) (экспрессия bcl-2) и иммуногистохимическим (ИГХ) (экспрессия p16 и Ki-67) методами. Для статистической обработки полученных результатов использован критерий  $\chi^2$  для произвольных таблиц.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Малоклеточные мазки были выявлены в 48% случаях, средноклеточные – в 32%, гиперклеточные – в 20%. Анизонуклеоз был сильно выражен в 16%, умеренно – в 24%, слабо – в 40%. Выраженная неровность ядерной мембраны отмечена в 8%, умеренная – в 16%, слабая – в 40%, отсутствовала – в 28%. Ядерный хроматин был гиперхромным в 32%, смешанным – в 44%, гипохромным – в 24%. Разная форма ядер встречалась во всех группах, однако наиболее часто она регистрировалась в группе СКЯВСЗ (в 83%), реже всего – в группе доброкачественных опухолей (в 30%). Ядрышки были множественными в 48%, единичными – в 24%, не визуализировались – в 28% случаев. Статистически значимые различия были определены только в отношении двух изучаемых параметров – ядерный полиморфизм и неровность ядерной мембраны, которые в группе СКЯВСЗ выявлялись достоверно чаще ( $p < 0,05$ ). При гистологическом исследовании удаленных маточных труб в группе СКЯВСЗ во всех случаях была выявлена СТИК (в 43% в сочетании с инвазивной карциномой маточной трубы), во всех случаях отмечалось более 10 SCOUT (более 30 подряд расположенных се-

креторных клеток). В группе пограничных опухолей в 72% отмечалось наличие папиллярной гиперплазии маточной трубы, в 28% – неизменный эпителий маточной трубы, более 10 SCOUT зарегистрировано в 60% случаев. В группе доброкачественных опухолей яичника отмечено наличие более 10 SCOUT в 20% случаев, в остальных случаях выявлен неизменный эпителий маточной трубы. Таким образом, СТИК и более 10 SCOUT достоверно чаще выявлялись при СКЯВСЗ, а папиллярная гиперплазия маточной трубы – при пограничных опухолях яичника ( $p < 0,01$ ).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что с помощью цитологического метода можно верифицировать злокачественные и доброкачественные клетки эпителия маточной трубы, а также диагностировать такие предраковые поражения, как СТИК. Это дает возможность предположить, что метод жидкостной цитологии может быть использован для скринингового исследования интраэпителиальных поражений маточной трубы.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ «Мой первый грант» (проект 16 16-34-00666/16).*

#### **Сафарова Ю.И.<sup>1</sup>, Олжаев Ф.С.<sup>1</sup>, Умбаев Б.А.<sup>1</sup>, Мурата Х.<sup>2</sup>, Рассел А.<sup>2</sup>, Аскарова Ш.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *National Laboratory Astana, Nazarbayev University*

<sup>2</sup> *Institute for Complex Engineered Systems, Carnegie Mellon University  
shaskarova@nu.edu.kz*

#### **МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСТЕОФИЛЬНЫМ ПОЛИМЕРОМ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Остеопороз занимает четвертое место в мире в структуре заболеваний, наряду с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и сахарным диабетом. Каждые 3 сек. в мире возникает остеопороз-ассоциированный перелом (ОАП), что составляет более 8,9 млн переломов ежегодно. Распространенность инвалидности вследствие ОАП к 2025 г.

в мире составит около 2.6 млн случаев, а число случаев смерти после перелома бедра достигнет порядка 700 тысяч в год. В настоящее время при лечении костных повреждений используются различные остеогенные материалы, но ни один из них не в состоянии обеспечить высокую эффективность проводимой терапии при патологических ОАП. Таким образом, разработка альтернативных, клинически применимых методов терапии последствий остеопороз-ассоциированных переломов костей является весьма актуальной. Исходя из вышесказанного, была предложена возможность применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК), модифицированных остеофильным бисфосфонатным полимером, для стимулирования процессов репаративного остеогенеза в зоне замедленного сращения переломов при остеопорозе и схожих патологиях. Результаты проведенных исследований показали, что полимер способен стабильно связываться с клеточной мембраной и обеспечивать аффинность МСК к костной ткани *in vitro*, при этом не влияя на процессы пролиферации и остеогенной дифференцировки МСК. *In vivo* была создана животная модель перелома диафиза локтевой кости на фоне эстроген-зависимого

остеопороза. Животные (белые беспородные крысы) были разделены на 4 группы. Животным одной группы в зону индуцированного перелома локтевой кости 1 раз в неделю в течение 1 мес. вводили МСК, модифицированные остеофильным полимером; двум другим группам животных вводили либо остеофильный полимер, либо немодифицированные МСК; последняя группа служила контролем. Прижизненный морфометрический микроКТ анализ показал, что локальное введение МСК, модифицированных полимером, приводило к значительному (34%) увеличению плотности костной ткани в месте перелома по сравнению с животными других групп. Результаты прижизненной оценки регенерации костной ткани были подтверждены гистологически. Таким образом, результаты доклинических исследований показали, что предлагаемый нами комплексный подход, основанный на применении клеточной терапии МСК, модифицированных остеофильным полимером, является эффективным способом стимуляции репаративного остеогенеза в зоне замедленного сращения переломов при остеопорозе.

Финансирование исследования: *Грантовое финансирование.*

**Афанасьев С.А.<sup>1</sup>, Кондратьева Д.С.<sup>1</sup>,  
Усов В.Ю.<sup>1</sup>, Лебедева А.И.<sup>2</sup>, Муслимов С.А.<sup>2</sup>,  
Попов С.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Томский Национальный исследовательский медицинский центр, НИИ кардиологии

<sup>2</sup> ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России  
Tursky@cardio-tomsk.ru

#### **ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДИСПЕРГИРОВАННОЙ ФОРМЫ БЕСКЛЕТОЧНОГО БИОРЕПАРАТА «АЛЛОПЛАНТ» ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Доказано, что инфаркт миокарда неизбежно сопровождается некрозом части сердечной мышцы, формированием рубца или аневризмы. Это приводит к ремоделированию сердца и нарушению его функций.

**ЦЕЛЬ.** В эксперименте показать возможность, с помощью выполнения интрамиокардиальных инъекций биопрепарата аллоплант, предупреждать развитие постинфарктного ремоделирования сердца.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** На самцах крыс линии Вистар, массой 180–200 г. моделировали инфаркт миокарда, перевязывая левую нисходящую коронарную артерию. Затем в стенку левого желудочка сердца вводили биоматериал аллоплант. Исходно, через 7, 14 и 48 сут. после инфаркта миокарда проводили МРТ исследования сердца. Через 45 сут., крыс выводили из эксперимента. Измеряли размер зоны рубца и морфометрические показатели сердца. Крысы с инфарктом миокарда, но без аллопланта, служили контролем.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Данные МРТ исследований показали, что к 7 суткам после моделирования инфаркта миокарда и у контрольных крыс, и у крыс с введением аллопланта наблюдались явные признаки постинфарктного ремоделирования. Однако на последующих сроках у крыс с аллоплантом, в отличие от контрольных животных, мы не выявили увеличения изменений, свидетельствующих о развитии постинфарктного ремоделирования сердца. При этом

к 45 сут. крысы контрольной группы и крысы с аллоплантом достоверно различались по всем рассматриваемым параметрам. Результаты морфометрических обследований сердца тоже показали, что в контрольной группе коронароокклюзия приводила к развитию постинфарктного кардиосклероза и аневризмы у всех животных (100%), размер рубца составлял более 40% от площади левого желудочка. Для животных этой группы было характерно высокое значение индекса – Масса сердца/масса тела. У животных, которым одновременно с коронароокклюзией выполняли инъекции аллопланта, отсутствовала аневризма, а формирование видимого постинфарктного рубца отмечено только у 45% животных.

**ВЫВОДЫ.** Интрамиокардиальные инъекции биоматериала аллоплант, выполненные сразу после моделирования экспериментального инфаркта миокарда, обеспечивают предупреждение постинфарктного ремоделирования сердца.

**Ахмадишина Р.А., Кузнецова Е.В.,  
Садриева Г.Р., Сабирзянова Л.Р.,  
Низамов И.С., Ахмедова Г.Р., Низамов И.Д.,  
Абдуллин Т.И.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет

г.а.akhmadishina@mail.ru

#### **АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ ТРИПЕПТИДА ГЛУТАТИОНА С ДИТИОФОСФОРНЫМИ КИСЛОТАМИ IN VITRO**

Редокс-статус является важным параметром клеток млекопитающих, влияющим на их пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность. Редокс-статус определяется соотношением окисленных и восстановленных форм метаболитов, а также активностью свободных радикалов. Применение антиоксидантов представляет собой перспективный подход к защите клеток и тканей и регуляции репаративных процессов. Трипептид глутатион (GSH) выступает преобладающим внутриклеточным антиоксидантом, играющим важную физиологическую роль, однако, терапевтические приложения GSH ограничены вследствие его низкой стабильности и внутриклеточного проникновения. В работе исследованы новые производные глутатиона – соли GSH с O,O-диорганилдитиофосфорными кислотами (ДФК), содержащими алкильные и монотерпенильные заместители. По данным DPPH-теста в реакции с радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом, соли GSH-ДФК обладают повышенной радикал-связывающей активностью по сравнению с глутатионом (EC50 = 248 мкМ), но относительно слабо ингибируют реакцию Фентона с участием ионов кобальта и пероксида водорода. Высокая антиоксидантная активность солей GSH-ДФК также показана на монослоях фибробластов кожи и клетках феохромоцитомы крысы (PC-12), подвергнутых окислительному стрессу. Наибольшую активность показала соль GSH-ДФК на основе L-ментола, которая уже в концентрации 100 мкМ ингибировала образование АФК в клетках, тогда как свободный GSH проявлял антиоксидантный эффект в концентрации >1 мМ. Оценено влияние соли GSH-ДФК на основе L-ментола в концентрациях << IC50 на дифференцировку клеток PC-12. Обнаружено, что в дифференцирующих

условиях производное глутатиона отдельно и в комбинации с NGF замедляет пролиферацию клеток и существенно изменяет их морфологию. Обработанные клетки приобретают более плотную цитоплазму и отростки, характерные для начальных стадий дифференцировки в нейрональном направлении. Результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования солей глутатиона с ДТФК в качестве улучшенных антиоксидантов для цитопротекции и регенерации тканей.

#### Литература:

1. Schafer, F.Q., Buettner, G.R. Free Radic. Biol. Med., 2001, 30, 1191–1212.
2. Dickinson, D.A., Forman, H.J., Biochem. Pharmacol., 2002, 64, 1019–1026.
3. Nizamov, I. S., Sofronov, A. V., et al. Russ. J. Gen. Chem., 2010, 80, 1722–1723.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-03-00897-а, 16-54-10059-КО-а и в рамках Государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

#### **Ахметзянова Э.Р., Журавлева М.Н., Галиева Л.Р., Мухамедшина Я.О.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
elyaelya18@gmail.com

#### **ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ НА СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ**

Травматические повреждения центральной нервной системы (ЦНС) запускают целый каскад патологических реакций, в числе которых апоптоз, окислительный стресс, дезинтеграция цитоскелета и др. Именно эти процессы приводят к серьезным изменениям нервных структур, что приводит к инвалидизации пациентов. На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения травматических повреждений спинного мозга, приводящих к восстановлению нервной ткани. Клетки микроглии первыми реагируют на повреждения ЦНС и в дальнейшем принимают участие во всех ключевых звеньях патогенеза. При активации микроглия удаляет клеточный дебрис, выделяет противо- и провоспалительные цитокины и хемокины, оксид азота, нейротрофины и антиоксиданты, способные оказывать как нейротоксический, так и нейротрофический эффекты. Ранее мы показали, что глиальный нейротрофический фактор (GDNF) способен ослаблять фагоцитарную активность микроглии [1]. В связи с этим мы решили определить, насколько фагоцитарная активность микроглии в острый период травмы спинного мозга (ТСМ) крысы может предопределить исход посттравматических процессов. Для этого в область ТСМ (острый период) мы трансплантировали генетически-модифицированные Ad5-EGFP или Ad5-GDNF клетки микроглии. В ходе исследования мы обнаружили, что в группе с трансплантацией клеток микроглии, трансдуцированных Ad5-GDNF и имеющих меньшую фагоцитарную активность, площадь сохраненной ткани была меньше, чем в группе с трансплантацией клеток микроглии, трансдуцированных Ad5-EGFP, не оказывающего влияния на активность клеток. В то же время, достоверной

разницы в показателе функционального восстановления между данными группами обнаружено не было. Таким образом, увеличение количества клеток микроглии с хорошей фагоцитарной активностью в области ТСМ может способствовать увеличению сохранности нервной ткани, не оказывая значимого эффекта на функциональное восстановление в течении 30 сут. после повреждения.

#### Литература:

1. Zhuravleva, Margarita, Albert Rizvanov and Yana Mukhamedshina. «Effect of GDNF on Morphology, Proliferation, and Phagocytic Activity of Rat Neonatal Cortex Isolated Microglia.» BioNanoScience 6.4 (2016): 379-383.

#### **Бабушкина И.В., Гладкова Е.В.**

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.В. Разумовского» Минздрава России  
10051968@mail.ru

#### **ПРЕПАРАТ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ**

В связи со сложностями регенерации гнойных ран и многообразием вариантов их течения за счет различия этиологических агентов возникает потребность в разработке препаратов широкого спектра действия, позволяющих оказывать лечебное воздействие в зависимости от особенностей течения процесса. Задачей разработки данного порошкообразного ранозаживляющего препарата было расширение возможностей его применения, в том числе, для лечения ран с обильной экссудацией, инфицированных не только грамотрицательными и грамположительными бактериями, но и грибами, а также их ассоциатами. Разработан порошкообразный препарат на основе наночастиц меди и серебра, обладающий, кроме регенерирующего, также антибактериальным и антимикотическим действием. Препарат отличается от ранее представленных композиций наличием в составе оксида цинка, обладающего антибактериальным и фунгицидным действием, что является важным при профилактике вторичных кандидозов и при лечении ран, инфицированными грибами рода *Candida*, а также выраженным адсорбирующим и противовоспалительным эффектом, что обеспечивает патогенетическое обоснование его применения при лечении гнойных ран с обильной экссудацией и ускоряет процесс заживления. Проведены бактериологические, планиметрические, цитологические и гистоморфологические исследования на модели гнойной раны, инфицированной ассоциатом клинических штаммов микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*). Применение препарата оказало выраженное влияние на регенерацию раны во все сроки проведения контрольных измерений, к 7-м суткам исследования в опытной группе наблюдалось полное заживления раны, в то время как в группе сравнения процент заживления составил 54,3%. Также изучены суточное изменение площади ран (в%), скорость заживления ран (в мм<sup>2</sup>/сут), которые подтвердили высокую регенерирующую активность препарата. Бактериологические исследования продемонстрировали, что за короткий срок происходит уничтожение контаминирующих рану возбудителей, в том числе грибов рода *Candida*. На 5-е сут. наблюдения в опытной группе отмечали статистически достоверное снижение обсемененности раны грибами рода

*Candida* до 103 КОЕ/г. Культура золотистого стафилококка высевалась до 5-го дня, в группе сравнения — до 14 дня. К 14-м суткам наблюдения у животных опытной группы наблюдалась полная элиминация всех контаминирующих возбудителей и заживление раны. У животных группы сравнения до 14-х сут. высевался *S. aureus*, площадь раны к 14-м сут. сократилась на 27% от исходной. Наиболее важной является способность препарата создавать бактерицидные концентрации наночастиц меди и серебра в гнойном очаге, не оказывая системного влияния. При лечении ран комплексным препаратом в короткий срок достигается полная эрадикация патогенных возбудителей и надежная профилактика реинфицирования раневой поверхности без общей антимикробной терапии. Разработанный препарат на основе наночастиц меди и серебра оказывает выраженное стимулирующее действие на репаративную регенерацию мягких тканей и может быть использован при разных типах повреждений покровных тканей, что позволяет сократить сроки заживления и полностью отказаться от применения антибиотиков, избежать развития побочных реакций и селекции антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

**Багиров А.Б., Цискарашвили А.В.,  
Кузьменков К.А., Жадин А.В., Лаймуна К.А.**

*Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова  
bagirov-ab@yandex.ru*

#### **РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ В ЗОНЕ ОСТЕОТОМИИ ПРИ КОРРЕКЦИИ ФОРМЫ И ДЛИНЫ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Высокий уровень научно-технического прогресса — расширение диагностических возможностей, совершенствование анестезиологического обеспечения, внедрение малотравматичных методик остеосинтеза позволяет расширить объем ортопедических операций и выполнить оперативные вмешательства на нескольких сегментах одновременно. Путь достижения этого лежит через создание искусственного перелома — остеотомии с дальнейшим сращением этого участка. Сращение остеотомированного участка представляет собой непростую задачу, а иногда создает серьезные проблемы с минерализацией дистракционного регенерата. В зависимости от жалоб и состояния пациента может выполняться изменение формы путем устранения деформации, удлинение или укорочение одной или нескольких костей конечностей. Целью нашего исследования является изучение регенеративного процесса в остеотомированных участках при выполнении симультанных полисегментарных операций на костях при коррекции формы и длины нижних конечностей. В работе кроме рутинных методов обследований использовано КТ-исследование нижних конечностей по разработанной нами схеме, которая позволяла детализированно изучать проекционную и объемную характеристику каждой конечности в отдельности и в сравнении. Результат этого исследования являлся основанием для выбора малогабаритных функциональных компонентов аппарата наружной фиксации, позволяющих производить операции на нескольких сегментах. На основании клинико-рентгенологической картины проводилось оценка процесса минерализации регенерата до полной его консолидации и определения

времени снятия аппарата наружной фиксации. Таким образом, результат нашего исследования свидетельствует, что при коррекции формы и длины нижних конечностей применение симультанных полисегментарных операций позволяет восстановить анатомию сегментов в комплексе и значительно сокращает общий срок лечения и восстановления пациентов.

**Николаева И.Э.<sup>1,2</sup>, Байзынова Я.М.<sup>1</sup>,  
Киселева В.В.<sup>1</sup>, Хрипкова Н.А.<sup>1</sup>,  
Балашова Е.Н.<sup>3</sup>, Осипова Е.Ю.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева*

<sup>2</sup> *ФГАОУВ «Московский физико-технический институт», факультет биологической и медицинской физики*

<sup>3</sup> *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им.*

*акад. В.И. Кулакова»*

*yanabayzanova@yandex.ru*

#### **ЭКСПАНСИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ТКАНИ ПУПОВИНЫ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ И ОЦЕНКА ИХ ИММУНОФЕНОТИПА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Изучение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) открывает перспективы в лечении различных заболеваний, поэтому растет интерес к их изучению. МСК — это мультипотентные негемопоэтические клетки, обладающие репаративным потенциалом, способные к дифференцировке в трех направлениях (адипогенный, хондрогенный и остеогенный), к продукции цитокинов и ростовых факторов. Самый распространённый источник МСК — это костный мозг и жировая ткань, но при ряде патологий, к примеру бронхолегочная дисплазия новорожденных (БЛД), рациональнее применять МСК, выделенные из пуповинной крови (ПК) или ткани пуповины (ТП). БЛД развивается практически у всех детей, рожденных до 34 нед. гестации через 3–4 нед. после рождения, и трудно поддается лечению по существующим схемам. Одним из вариантов лечения, направленного на патофизиологические процессы, является применение МСК, выделенных из ПК и ТП. Поиск оптимального источника МСК во внеэмбриональных тканях является приоритетным направлением.

**ЦЕЛЬ.** Провести экспансию и охарактеризовать МСК из ПК, ТП недоношенных новорожденных различного гестационного возраста.

**ЗАДАЧИ:** 1. Выделить первичную культуру МСК из ПК и ТП; 2. Оценить клетки на их соответствие критериям МСК; 3. Провести сравнительный анализ результатов иммунофенотипирования (ИФТ) с результатами группы сравнения из костного мозга; 4. Оценить возможность выращивания МСК для дальнейшего использования в клеточной терапии БЛД.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 4 образца ПК, 7 образцов ТП получены из НЦАПГ им. В.И. Кулакова с письменным информированным согласием рожениц. Гестационный возраст новорожденных 29–35 нед. Забор образцов проводился после рождения. Мононуклеарная фракция из ПК выделялась по стандартным протоколам на фикколе, ТП обрабатывалась согласно стандартным протоколам с помощью коллагеназы. Для культивирования клеток использовалась полная

питательная среда StemMACSMSCExpansionMedia, human. От забора материала и до получения конечного продукта прошло 4-5 недель. При ИФТ использовались конъюгированные флуорохромами антитела: CD34-PerCP, CD45 PerCP; CD14PerCP, CD20-PerCP, CD13FICT, HLA-DRPE, CD105PE, CD90FITC, CD73APC.

**РЕЗУЛЬТАТЫ 1.** Выделено 11 первичных культур МСК из ПК,ТП. Из ТП выделяется адекватное количество МСК, в отличие от ПК. 2. Полученные МСК соответствуют критериям: адгезия к пластике, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD73 и CD90, при этом маркеры гемопоэтических клеток и клеток-предшественников CD34, CD45, CD14, CD20, CD13, HLA-DR отсутствовали. 3. При ИФТ сравнении с костным мозгом, ТП полностью соответствует критериям МСК. В МСК ПК наблюдались маркеры МНС II-класса HLA-DR. 4. Выращивание и экспансия МСК из ПК для дальнейшего применения в терапии БЛД не доказал своей эффективности в связи с недостаточным количеством выделенных МСК. Из ТП набирается адекватное количество МСК как у недоношенных новорожденных, так и доношенных новорожденных. Для дальнейших клинических исследований клеточной терапии БЛД целесообразно использовать МСК из ткани пуповины.

**Баклаушев В.П.<sup>1</sup>, Дуров О.В.<sup>1</sup>, Богуш В.Г.<sup>2</sup>, Кальсин В.А.<sup>1</sup>, Конопляников М.А.<sup>1</sup>, Аверьянов А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр ФМБА России

<sup>2</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
serpoff@icloud.com

### **ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ — ИССЛЕДОВАНИЕ НА НЕЧЕЛОВЕКООБРАЗНЫХ ПРИМАТАХ**

В экспериментах *in vivo* на макаках-резусах с моделированным дозированным повреждением спинного мозга исследовали биосовместимость и возможность применения для регенеративной терапии спинальной травмы тканеинженерных конструкций, включающих первично репрограммированные нейральные прогениторные клетки (drNPCs), твердый анизотропный скаффолд, изготовленный методом электроспиннинга из рекомбинантного белка каркасной нити паутины — спидроина-1 и «жидкий матрикс» на основе плазмы, обогащённой тромбоцитами (PRP), а также нейральной среды с факторами роста. Предварительно *in vitro* было показано, что заключение в «жидкий матрикс» drNPCs драматически активирует нейрогенез, а применение двухкомпонентного матрикса, включающего анизотропный спидроиновый скаффолд способствует адгезии drNPCs с последующей нейральной дифференцировкой и ориентацией аксонов вдоль направления спидроинового фибрилл. В результате, спустя две недели были получены тканеинженерные конструкции, состоящие из нейронов, с ориентированными в одном направлении отростками. drNPCs и тканеинженерные конструкции были испытаны на приматах с моделированной спинальной травмой. Путем мониторинга МРТ головного и спинного мозга, неврологического статуса и соматосенсорных и моторных вы-

званных потенциалов показано, что разработанные тканеинженерные конструкции способствуют восстановлению эфферентной и афферентной иннервации и регрессу неврологических нарушений у приматов. Последующий гистологический и иммуногистохимический анализ показал, что пересаженные в составе тканеинженерных конструкций drNPCs выживают и дифференцируются в нейральном направлении.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-15-10432).*

**Баранова Н.В., Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Севастьянов В.И.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов» им. В.И. Шумакова  
Минздрава России  
barnats@yandex.ru

### **МИКРОГЕТЕРОГЕННЫЙ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИЙ ГИДРОГЕЛЬ КАК МАТРИКС ДЛЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ**

Острейшей проблемой современной клинической трансплантологии является нехватка донорских органов, что стимулировало поиск подходов, основанных на технологиях тканевой инженерии и регенеративной медицины, для лечения ряда серьезных заболеваний. Трансплантация островков Лангерганса (ОЛ) является обещающей альтернативой органной трансплантации поджелудочной железы при лечении сахарного диабета и может обеспечивать инсулинонезависимость больных на некоторый срок. Основная проблема при культивировании и трансплантации островков связана с невозможностью обеспечения длительной жизнеспособности и функциональной активности выделенных ОЛ. Изолированные островки лишаются не только васкуляризации и иннервации, но и утрачивают связи с внеклеточным матриксом (ВКМ), играющим определяющую роль в поддержании их жизнеспособности. Воссоздание нативного микроокружения с использованием матрикса — биомиметиков ВКМ может способствовать сохранению структуры и функции изолированных ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo*. К таким биомиметикам ВКМ относится биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ матрикс).

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Изучение эффективности использования БМКГ в качестве матрикса при культивировании изолированных ОЛ ПЖ крысы.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование проводили на половозрелых крысах линии Wistar. Островки изолировали, ориентируясь на классическую методику с использованием коллагеназы с некоторыми модификациями. Идентификацию и подсчет ОЛ осуществляли, проводя окрашивание дитизоном. Островки, культивированные с БМКГ матриксом (АО «Биомир сервис»), считались опытными, а островки, культивированные в стандартных условиях, рассматривались в качестве контрольных. Жизнеспособность ОЛ определяли методом иммуофлуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом. Для морфологического исследования использовались методы гистологического и иммуногистохимического анализов.



**РЕЗУЛЬТАТЫ.** ОЛ (опытные и контрольные) в течение первых 3 сут. культивирования сохраняли первоначальные внешние характеристики. Иммунофлуоресцентное окрашивание демонстрировало зеленую флуоресценцию островков, подтверждающую их жизнеспособность. На 6 сут. культивирования большая часть контрольных ОЛ претерпевала деструктивные изменения, тогда как островки, культивируемые с БМКГ, не обнаруживали признаков деградации структуры и, по результатам иммунофлуоресцентного анализа, сохраняли жизнеспособность в течение 7 сут. культивирования. Гистологическое исследование показало сохранение структурной целостности опытных ОЛ и выявило наличие многочисленных хорошо гранулированных инсулин-позитивных клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Культивирование изолированных ОЛ крысы с БМКГ способствует сохранению жизнеспособности, целостности и характерной структуры островков, что дает основание надеяться на возможность создания длительно функционирующих имплантируемых биомедицинских клеточных продуктов — клеточно- и тканеинженерных конструкций поджелудочной железы.

#### **Барановский Д.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

<sup>2</sup> University Hospital of Basel  
denis.baranovskii@usb.ch

#### **РЕКОНСТРУКЦИЯ КРИТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОГЕННОЙ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ КОСТНОГО МОЗГА, ПОЛУЧЕННОЙ ИНТРАОПЕРАЦИОННО**

**ВВЕДЕНИЕ.** «Критический дефект» костной ткани — ортотопический дефект, который не может зажить самопроизвольно на протяжении жизни пациента без постороннего специального вмешательства. Современные методы консервативного ведения пациентов не позволяют решить проблему, а хирургические методики лечения, такие как ауто-трансплантация кости, сопряжены с рядом ограничений и рисками неприживления трансплантата. Регенеративная медицина позволяет индуцировать регенерацию поврежденных тканей, восстанавливать их отдельные дефекты собственными стволовыми клетками. Так, реконструкция костной ткани с использованием ауто-трансплантата кости может стать более эффективной при дополнительном использовании клеточного компонента, способного увеличить остеогенез. Основными преимуществами применения метода регенеративной медицины перед существующими методиками лечения являются существенное снижение рисков послеоперационного некроза или неприживления трансплантата.

**ЦЕЛЬ.** Целью настоящего исследования является оценка способности клеток мононуклеарной фракции, полученной интраоперационно с использованием аппарата клеточной сепарации SepaxBiosafe к пролиферации в контакте с аутогенной костной тканью в условиях *in vitro* и колонизации костной ткани пациента.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В данном исследовании красный костный мозг и костная крошка забирались у одного пациента интраоперационно в ходе эндопротезирования тазобедренного сустава. Выделение мононуклеарной фракции клеток костного мозга пациента, содержащей аутогенные мезенхимальные

стволовые клетки, выполнялось методом градиентного центрифугирования в стерильном замкнутом контуре с использованием аппарата клеточной сепарации «SepaxBiosafe» (Швейцария). Полученная суспензия распределялась в 96-луночные планшеты. В опытные лунки добавлялись измельченные фрагменты аутокостной ткани. В качестве контроля использовались лунки с измельченными фрагментами аутокостной ткани и аутогенным красным костным мозгом донора. В качестве отрицательного контроля использовались лунки, заполненные суспензией, но не содержащей костную ткань. На 7-е и 14-е сут. во всех лунках выполнялся МТТ-тест по стандартной методике, колонизация костных фрагментов клетками мононуклеарной фракции анализировалась методом флуоресцентной микроскопии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Клетки мононуклеарной фракции человека демонстрируют более высокий пролиферативный потенциал относительно необработанной суспензии клеток костного мозга уже на 7 сут. культивирования (0,31 OD и 0,29 OD соответственно), который существенно увеличивается в течение последующей недели (0,35 OD и 0,25 OD на 14 сут. соответственно). Флуоресцентная микроскопия подтвердила интенсивные темпы колонизации костной ткани клетками изолированной фракции.

**ОБСУЖДЕНИЕ:** Разрабатываемый метод отличается простотой применения, относительно низкой стоимостью и сочетает в себе преимущества персонализированной медицины с доступностью максимально широкого применения за счет возможности промышленного производства необходимых материалов. Уверенность в эффективности технологии позволит расширять целевые группы пациентов не только по соматическим, но и по возрастному критерию.

#### **Басок Ю.Б., Василец В.Н., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Севастьянов В.И.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов»  
bjb2005@mail.ru

#### **РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОГАБАРИТНОГО БИОРЕАКТОРА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА**

В регенеративной медицине для создания *in vitro* тканеинженерных конструкций хрящевой ткани человека (ТИК ХТч) используют различного типа биореакторы — многокомпонентные аппаратные системы, обеспечивающие необходимые условия для дифференцировки и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур при их культивировании на 2D- или 3D-биосовместимых биостабильных или резорбируемых матриксах. Перфузионные биореакторы, по сравнению с другими системами, более эффективно обеспечивают транспорт питательных веществ и газов к клеткам, а также выведение от них продуктов обмена веществ, имитируя физиологические условия для формирования тканевого эквивалента. Кроме того, замкнутая система проточного биореактора позволяет обеспечить стерильность.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ** — разработка и апробирование компактного перфузионного биореактора с четырьмя культуральными камерами для формирования ТИК ХТч.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Биореактор включал в себя две системы циркуляции. В каждой из них к резервуару с культуральной средой параллельно подключали две камеры. На пористую нижнюю часть культуральных камер помещали подложку, мембрану («MerckMilliporeLtd.», Ирландия), которая удерживала матрикс, биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) (АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск), с мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани человека (МСК ЖТч). Биореактор помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Выбор материала для подложки был сделан на основании оценки цитотоксичности и матриксных свойств на фибробластах мыши линии 3T3, а оптимальный размер пор в ней по величине создаваемого давления в биореакторе, заполненного модельным раствором. Клеточно-инженерные конструкции (КИК) ЖТч первые сутки культивировали в ростовой среде MesenPRORS™ (Gibco® byLifeTechnologies™, США), затем помещали в проточный биореактор при скорости 0,5 мл/мин и объеме циркулирующей среды 110 мл. Через сутки ростовую среду заменяли на индукционную хондрогенную STEMPRO® (Gibco® byLifeTechnologies™, США). Жизнеспособность клеток оценивали методом флуоресцентного окрашивания «Live/Dead» («Invitrogen», США). Морфологическое исследование проводили, используя методы гистологического окрашивания.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** В качестве материала подложки для КИК выбрали нейлон, проявляющий биологическую инертность, так как поликарбонат, обладающий матриксными свойствами, мог бы повлиять на развитие КИК. Мембрана с размером пор 10 мкм создавала меньшее давление в системе, чем подложка с размером пор 5 мкм, и была выбрана для дальнейших экспериментов. Через 16 дней эксперимента наблюдали прогрессивное нарастание клеточной массы со значительным образованием внеклеточного матрикса (ВКМ), причем форма клеток изменилась до уплотненной и вытянутой, а соотношение клеток и ВКМ поменялось в пользу последнего.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** МСК ЖТч в БМКГ проявили высокую пролиферативную активность с формированием собственного ВКМ, что указывает на перспективность префузионного биореактора для создания ТИК ЖТч.

Финансирование исследования: *Госзадание Минздрава России; частично за счет средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта 16-29-07322).*

**Бахмет Е.И.<sup>1</sup>, Назаров И.Б.<sup>1</sup>, Кузьмин А.А.<sup>1</sup>, Синенко С.А.<sup>1</sup>, Артамонова Т.О.<sup>2</sup>, Ходорковский М.А.<sup>2</sup>, Томилин А.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
e.bakhmet@incras.ru

#### **РОЛЬ HNRNP-K В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ OCT-4**

Ген Pou5f1 кодирует ключевой для плюрипотентных стволовых клеток транскрипционный фактор Oct-4. Вместе с Sox2 они образуют гетеродимер и регулируют транскрипцию собственных генов, а также Nanog, Fgf4, Utf1, Fbx15. Oct-4 является незаме-

нимым при индуцировании плюрипотентности. Кроме того, нокадаун Pou5f1 ведет к дифференцировке плюрипотентных клеток. Регуляция гена Pou5f1 происходит через промотор, проксимальный энхансер и дистальный энхансер. Во время транскрипции Pou5f1, эти последовательности являются мишенями для связывания с регуляторными белками. На ранних стадиях эмбриогенеза до имплантации, а также в культивируемых эмбриональных стволовых клетках мыши ключевую роль играет дистальный энхансер, который в свою очередь имеет две важные последовательности – сайт 2A и сайт 2B. С сайтом 2B связывается уже описанный гетеродимер Oct-4-Sox2. При этом, точно не установлены белки-кандидаты на связывание с сайтом 2A (CCCCCTCCCCC). В ходе наших *in vitro* исследований с помощью методов гель-ретардации, аффинной хроматографии и масс-спектрометрии, было выявлено несколько представителей семейства поли(Ц)-связывающих белков – hnRNPK, Pcbp1, Pcbp2. В первую очередь, они известны как РНК-связывающие белки, однако, есть данные и о транскрипционной регуляции посредством их связывания с ДНК. Была подтверждена их роль в регуляции экспрессии BRCA1 и муопиоидного рецептора. Более того, было показано, что во время нокадауна hnRNPK, падает экспрессия таких плюрипотентных маркеров, как Oct-4, Nanog и Rex1. В случае с Oct-4, это хорошо согласуется с полученными нами результатами. Мы также проверили влияние нокаута hnRNPK и Pcbp1 на экспрессию Oct-4 с помощью системы CRISPR-Cas9 на эмбриональных стволовых клетках мыши. Оказалось, что в отсутствие hnRNPK, через 4 дня снижается уровень Oct-4. При более длительном культивировании такой нокаут приводит к гибели клеток, что не связано с плюрипотентностью, т. к. такой же эффект наблюдался нами и на фибробластах линии NIH 3T3. При этом, нокаут Pcbp1 никак не отразился ни на экспрессии Oct-4, ни на жизнеспособности клеток. В настоящее время, мы работаем над подтверждением связи hnRNPK с дистальным энхансером *in vivo* с помощью метода хроматин-иммунопреципитации.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ 17-14-01407.*

**Белоглазова И.Б.<sup>1</sup>, Зубкова Е.С.<sup>1</sup>, Коптелова Н.В.<sup>2</sup>, Дыйканов Д.Т.<sup>2</sup>, Дергилев К.В.<sup>1</sup>, Ратнер Е.И.<sup>1</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова  
irene.beloglazova@gmail.com

#### **УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА – ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР СБОРКИ СОСУДИСТОЙ СЕТИ ПРИ КО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ**

Для получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций очень важно понимание клеточных и молекулярных событий, связанных с образованием сети кровеносных сосудов. Известно, что для полноценного заживления поврежденной ткани необходимым условием является быстрое восстановление ее кровоснабжения за счет формирова-

ния функциональной сосудистой сети, которое происходит при взаимодействии эндотелиальных (ЭК) и муральных клеток (МК). Среди МК особая роль в регуляции ангиогенеза принадлежит мезенхимальным стволовым (стромальным) клетками (МСК), которые локализируются в сосудистом компартменте тканей и органов, принимая активное участие в репарации ткани, прежде всего через регуляцию ангиогенеза и воспалительного и иммунного ответа на повреждение. Целью нашей работы было исследование механизмов, посредством которых МСК могут координировать образование первичной сосудистой сети ЭК. Было обнаружено, что в условиях контактного ко-культивирования на непокрытом пластике, МСК, полученные из жировой ткани, способствуют формированию ЭК (HUVEC) сосудоподобной сети (СПС). Этого не происходит при бесконтактном ко-культивировании этих клеток в трансвеллах с размером пор 4 мкм. Формирование СПС начинается после 14 ч. ко-культивирования ЭК и МСК, что совпадает по времени с синтезом и секрецией внеклеточного матрикса (ВМ) ко-культурой. После 24 ч. в ко-культуре отчетливо видны фибронектиновые филаменты, которые являются основой для сборки ВМ посредством связывания с другими матриксными белками. Однако, без МСК ЭК не образовывали СПС даже при помещении их на ВМ, синтезированный как монокультурами ЭК и МСК, так и ко-культурой в течение 48 ч. В то же время, если МСК культивировали в течение 48 ч., а затем высаживали на них ЭК, то формирование СПС наблюдалось уже через 24 ч. При контактном ко-культивировании ЭК с МСК происходило повышение секреции урокиназы (uPA) и экспрессии ее рецептора (uPAR) на поверхности ЭК, что важно для формирования СПС, так как блокирование uPAR с помощью специфических антител ингибировало этот процесс. Более того, антитела к  $\alpha v$ -субъединице интегрина также ингибировали образование СПС, что также может свидетельствовать об участии uPAR в данном процессе посредством его взаимодействия с витронектином, который взаимодействует с  $\alpha v$ -интегриновыми рецепторами. Важное значение для формирования СПС в присутствии МСК имеет также эндцитоз, поскольку добавление антагониста LRP – RAP, ингибитора внутриклеточного транспорта белков – монензина или ингибитора полимеризации микротрубочек колхицина – тормозили этот процесс. Антитела к ингибитору урокиназы PAI-1 также подавляли формирование СПС. Полученные результаты, свидетельствующие о важности прямых контактов между ЭК и МСК для формирования сосудистой сети и роли урокиназной системы в этом процессе, могут иметь значение для разработки технологий получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций.

Финансирование исследования: *РФФИ 16-04-01699.*

**Белостоцкая Г.Б.<sup>1</sup>, Галагудза М.М.<sup>2</sup>, Сонин Д.Л.<sup>2</sup>, Почкаева Е.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН*

<sup>2</sup> *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России*  
gbelost@mail.ru

### **МЕХАНИЗМЫ КАРДИОМИОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА: СМЕНА ПАРАДИГМЫ**

За последнее десятилетие трансплантация стволовых клеток (СК) стала перспективной стратегией лечения острого коронарного синдрома и постинфарктной сердечной недостаточности. При этом, несмотря на временное улучшение сократительной функции миокарда за счет паракринного эффекта трансплантированных клеток, не было зарегистрировано формирование новых кардиомиоцитов (КМ) в зоне повреждения. Это обстоятельство повернуло вектор исследований в сторону изучения факторов, секретируемых СК. К этим факторам, в совокупности называемым секретом СК, относят различные цитокины и факторы роста, мРНК и микроРНК, поступающие во внеклеточное пространство как в свободном виде, так и в составе мембранных везикул. Установлено, что секретируемые факторы могут подавлять воспаление и апоптоз, стимулировать ангиогенез, а также усиливать пролиферацию и дифференцировку кардиальных резидентных СК (КСК). В связи с этим в последнее время экзосомы, обогащенные белками, мРНК и микроРНК СК, рассматриваются в качестве потенциального терапевтического средства, обеспечивающего регенерацию миокарда. При этом поиск стимуляторов кардиомиогенеза продолжается на фоне непрекращающихся споров относительно возможности деления или дедифференцировки зрелых КМ, трансдифференцировки каких-либо клеток в КМ, а также способности резидентных КСК дифференцироваться в зрелые КМ. Однако отсутствие ответов на эти вопросы свидетельствует о том, что пора пересмотреть парадигму сложившихся представлений и стереотипов. Нужны либо новые кандидаты на роль клеток, способных дифференцироваться в КМ, либо новые знания о тех процессах, которые происходят в здоровом и поврежденном сердце. При этом данные последних лет о наличии в миокарде взрослых млекопитающих мелких (~10–18 мкм в диаметре) кардиально-позитивных клеток, способных к пролиферации и дифференцировке, а также тот факт, что их количество возрастает после гипоксии, ишемии и инфаркта, до сих пор не нашли объяснения. В связи с этим заслуживают внимания наши данные о внутриклеточном развитии КСК в КМ с образованием структур типа “клетка-внутри-клетки” (КВК) с последующим делением КСК и их частичной кардиомиогенной дифференцировкой, приводящей к формированию пула транзиторных клеток (ТК), выходящих из зрелых кардиомиоцитов в интерстиций миокарда. Показано, что имитация ишемии *in vitro* (гипоксия, ацидоз) приводила к 5–10-кратному увеличению количества КВК, а перманентная ишемия миокарда у взрослых крыс SPF категории показала 1,5-кратное увеличение количества КВК в зоне инфаркта по сравнению с контролем через 2 нед. после коронарной окклюзии. Эти данные позволили предположить, что вос-

паление в зоне инфаркта заставляет резидентные КСК внедряться внутрь сохранивших жизнеспособность КМ, временно выключая их из процесса регенерации. Однако последующий разрыв КВК и выход из них значительного количества (~200) ТК, которые способны к пролиферации и кардиодифференцировке, выдвигают их на первый план в качестве кандидатов для терапевтического воздействия на кардиомиогенез в ишемизированном сердце.

Финансирование исследования: *РФФИ (№ 12-04-00941 and 16-04-01424), Программа Президиума РАН ФН-Медицине (2012-2014) и Грант Правительства РФ 074-У01.*

**Белякова М.Б., Костюк Н.В., Егорова Е.Н.**

*ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России  
mayabe@yandex.ru*

**ФЕНОМЕН СОХРАНЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ НЕСКОЛЬКИХ ЦИКЛОВ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

Дедифференцированные жировые клетки (ДЖК) вызвали пристальный интерес исследователей в отношении их мультипотентных свойств. Было показано, что часть первичной культуры адипоцитов способна переходить в фибробластоподобное состояние, и затем дифференцироваться в адипоциты, остеоциты и хондроциты не только *in vitro*, но и *in vivo* (Wei S., 2013, Jumabay M., 2015). Методические трудности очистки адипоцитов от прогениторных клеток, на наш взгляд, требуют комбинировать ее с последующей селекцией популяции. В данной экспериментальной работе мы предлагаем никогда не применявшийся подход к изучению дедифференцировки адипоцитов, выявивший сохранение мультипотентных свойств при неоднократном обращении и повторении адипогенной дифференцировки. Объектом исследования являлись ДЖК из адипоцитов, как выделенных из жировой ткани крыс, так и полученных *in vitro* путем дифференцировки МСК-ЖТ. Метод потолочной культуры, дающий возможность флотировать адипоцитам прикрепиться и продемонстрировавший их способность дедифференцироваться в среде DMEMF12 (Sugihara H. et al.), был доработан нами для удобства микроскопии и манипуляций по переносу «потолочного» монослоя. Метод обеспечивает образование новой популяции из открепившихся адипоцитов, быстро погибающих в обычных условиях. С его применением нам удалось не только получить первичную культуру адипоцитов крысы, но и сформировать прикрепленный монослой из адипоцитов, образовавшихся в результате спонтанного (DMEM+10% FBS) и индуцированного гормонами (DMEM+10% FBS, инсулин, дексаметазон, IBMX) адипогенеза в культуре МСК-ЖТ. Микроскопический контроль за прикреплением флотировавших одиночных адипоцитов подтвердил отсутствие миграции с ними других клеток донного монослоя. Все потолочные культуры адипоцитов дедифференцировались 7 дней в бедной среде, постепенно теряя липиды и приобретая фибробластоподобную морфологию, пассировались и высевались как донная культура, после достижения конfluence вновь подвергались циклу адипогенной дифференцировки – флотации в потолочную культуру – дедифференциров-

ки. Новую потолочную популяцию ДЖК помещали в условия, ограничивающие пролиферацию и развивающие контактное торможение (DMEM с 10% BS, инкубация 15–25 дней), предполагая обнаружить адипоцитарную редифференцировку. Неожиданно в этих морфологически гомогенных популяциях, независимо от происхождения ДЖК, спонтанно образовывались не только адипоциты (3–7%), но и морфологически типичные остеоциты (1–2%) и изогенные группы хондроцитов (1–2%). Таким образом, для различных клеток жировой ткани возможна не только редифференцировка ДЖК и дедифференцировка, причем с повторением изменения дифференцировочного статуса клетки, но и возврат в мультипотентное состояние после повторной дедифференцировки. Обнаруженный феномен показывает существенные перспективы использования адипоцитов в регенеративной медицине в качестве громадного ресурса для получения мультипотентных клеток.

**Берченко Г.Н., Кесян Г.А.**

*Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова  
berchenko@cito-bone.ru*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА КОЛЛАПАН В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ДЛЯ АКТИВИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА**

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Экспериментально-морфологическое и клиническое обоснование применения материала Коллапан для замещения дефектов костной ткани и активизации репаративного остеогенеза у больных с незаживающими переломами и ложными суставами длинных костей конечностей.

**МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Экспериментально-морфологические исследования (осуществляются с 1993 г.) по влиянию Коллапана (кальций-фосфатный биокомпозиционный материал на основе синтетического гидроксиапатита, содержащий коллаген, антибиотики или наночастицы серебра) на активизацию репаративного остеогенеза в условиях условно асептических и инфицированных костных дефектов проведены более чем на 1500 животных (крысы, кролики, собаки). Клинический материал представлен более 630 больными с различными травматическими и ортопедическими заболеваниями, у которых при замещении дефектов костной ткани и активизации остеогенеза применяли материал Коллапан.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Экспериментально-морфологические исследования показали, что уже на 7–14 сут. после имплантации Коллапана в костный дефект, на его поверхности формировалась новообразованная остеоидная кость, признаки воспаления отсутствовали. В костном дефекте конгломераты имплантированного Коллапана служили многочисленными опорными точками, на поверхности которых формировались очаги остеогенеза. К 30–45 сут. в новообразованных костных трабекулах, подверженных созреванию, отмечалась постепенная биорезорбция гранул имплантата с их замещением новообразованной костью. Полученные в эксперименте данные об антимикробных, остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойствах Коллапана послужили основанием для его использования в клинической практике в качестве пластического материала при замещении дефектов костной ткани и стимуляции репаративного

остеогенеза. В последнее время на основании экспериментальных данных при остеосинтезе используется метод сочетанного применения Коллапана и обогащённой тромбоцитами аутоплазмы (PRP). Применение данного метода в комплексном лечении более 280 травматолого-ортопедических больных позволило добиться положительных результатов в 96,8% случаях при лечении высокоэнергетических и незаживающих переломов, ложных суставов длинных костей конечностей. Заключение. Коллапан является идеальным материалом в инжиниринге костной ткани при замещении костных дефектов, подавлении и предупреждении развития гнойных осложнений, стимуляции остеогенеза. Лечение незаживающих переломов и ложных суставов длинных костей конечностей с помощью остеосинтеза и сочетанного применения Коллапана с PRP, является безопасным и эффективным методом активизации репаративной регенерации кости, приводящим к уменьшению количества повторных госпитализаций этих больных.

**Бигильдеев А.Е.<sup>1</sup>, Пилунов А.М.<sup>2</sup>,  
Логачёва М.Д.<sup>3</sup>, Федотова А.В.<sup>3</sup>,  
Касьянов А.С.<sup>4</sup>, Петинати Н.А.<sup>1</sup>, Сац Н.В.<sup>1</sup>,  
Сурич В.Л.<sup>1</sup>, Дризе Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Гематологический научный центр»  
Минздрава России

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> Институт общей генетики РАН  
bigildeev.ae@gmail.com

#### **ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ШТРИХ-КОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛОНАЛЬНОГО СОСТАВА И ЕГО ДИНАМИКИ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ**

Знание о том, как устроена стромальная ткань костного мозга на клональном уровне, расширит возможности лечения гематологических заболеваний, связанных с поражением стромы. Исследование клонального состава стромы будет продуктивным, если будут разработаны эффективные методы маркирования индивидуальных мезенхимных клеток-предшественниц. Создание таких методов является актуальной задачей гематологии и регенеративной медицины. В работе изучали динамику изменения клонального состава мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, маркированных с помощью лентивирусных векторов, несущих генетические штрих-коды. МСК были получены от 6 здоровых доноров. По 105 клеток каждого донора были заражены клонированной библиотекой самонактивирующихся лентивирусных векторов 4-го поколения, несущих генетические штрих-коды. Библиотека содержала 671 неповторяющийся штрих-код, представляющих собой последовательности из 35 нуклеотидов. При каждом пассировании культуры 120 клеток клонировали в 96-лучные планшеты по 1 клетке на лунку. Подсчитывали эффективность клонирования и эффективность маркирования клоногенных клеток. Из клеточных колоний-клонов выделяли ДНК и идентифицировали штрих-коды с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Из общей клеточной популяции МСК каждого пассажира также выделяли ДНК и секвенировали совокупность штрих-кодов с помощью метода глубокого секве-

нирования на платформе Illumina. Было показано, что маркирование МСК лентивирусными векторами является стабильным и не снижает пролиферацию клеток. Анализ штрих-кодов в отдельных клеточных клонах показал, что МСК представляют собой поликлональную популяцию. При пассировании культуры её состав существенным образом меняется вследствие истощения пролиферативного потенциала большинства клеток. Результаты глубокого секвенирования подтвердили данные об изменении клонального состава МСК. Со временем в культуре увеличивается доля штрих-кодов, вносящих незначительный вклад в общую популяцию (с 10% до 20%), и наоборот, снижается доля штрих-кодов, вносящих существенный вклад (с 8% до 1%). Максимальный вклад штрих-кодов в общий пул составляет 1-2%, что соответствует 3000–6000 клеток. Медиана вклада штрих-кодов находится на уровне 0,1%, что соответствует 300 клеткам. Основная популяция МСК состоит из клеточных клонов, не превышающих по размеру 500 клеток. Вклад штрих-кодов в общую популяцию увеличивается по мере пассирования, что свидетельствует о том, что не делящиеся клетки в основном остаются в культуре. Результаты указывают на то, что популяция МСК поликлональна и в основном состоит из небольших клеточных клонов, проработавших не больше 9 делений. МСК содержат лишь небольшое количество клеток с высоким пролиферативным потенциалом, среди которых могут быть и стволовые. Маркирование МСК штрих-кодами позволит выявить и охарактеризовать настоящую субпопуляцию мезенхимных стволовых клеток.

Финансирование исследования: Грант РФФИ № 13-04-00085, ООО «Гематолог».

**Биялов А.И.<sup>1</sup>, Абызова М.С.<sup>2</sup>, Титова А.А.<sup>1</sup>,  
Мавликеев М.О.<sup>1</sup>, Бозо И.Я.<sup>3</sup>, Деев Р.В.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

<sup>3</sup> ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека»

<sup>4</sup> Рязанский государственный медицинский университет

BilyalovAir@yandex.ru

#### **ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПЛАЗМИДОЙ rCMV-VEGF165 ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ПОЛНОСЛОЙНОГО ДЕФЕКТА КОЖИ У КРЫС ПОСЛЕ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ**

ЦЕЛЬ исследования состояла в оценке влияния генной терапии плазмидой rCMV-VEGF165 на заживление дефекта кожи после аутодермопластики у крыс. Под эфирным наркозом на предварительно выбритом участке межлопаточной области у крыс (n = 16) выполняли отсепаровку полнослойного кожного лоскута размерами 2×2 см, который реплантировали и фиксировали по периметру узловыми швами. Животным экспериментальной группы внутрикожно вводили 1 мл раствора, содержащего 0,3 мг сверхскрученной плазмиды rCMV-VEGF165, по периферии дефекта кожи в восемь точек (по 125 мкл на одну точку) сразу после проведения операции. Животным контрольной группы (n = 8) производили инъекцию 1 мл 0,9% раствора NaCl. Оценку результатов и забор материала (аутооттрансплантата и части интактной кожи) производили на 3, 6, 9 12,

18 сут. Приживление оценивали макроскопически и с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Парафиновые срезы кожного лоскута окрашивали гематоксилином и эозином и иммуногистохимически ( $\alpha$ ГМА), производили морфометрический анализ размеров кожного дефекта и количества сосудов в поле зрения. Статистический анализ результатов проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни с уровнем значимости  $p < 0,05$ . В одном случае из восьми в экспериментальной группе наблюдалось полное приживление аутотрансплантата, в контроле во всех случаях наблюдалась гибель пересаженного кожного лоскута. В экспериментальной группе макроскопически полная гибель лоскута отмечается на 6 сут., на 3 дня позже, чем в контроле. По данным ЛДФ было выявлено межгрупповые различия показателя объемного кровотока в центральных участках не были статистически значимы. Сразу после операции объемный кровоток под лоскутом в экспериментальной группе был снижен до  $70,53 \pm 9,5\%$  (за 100% принято кровообращение в неповрежденном участке кожи); через 3 сут. составлял  $38,0\% \pm 5,9$ ; через 6 сут. –  $59 \pm 5,9\%$ ; на 9 сут. –  $56,9 \pm 5,9\%$ ; на 12 сут. –  $59,9 \pm 4,5\%$ , на 18 сут.  $88 \pm 3,5\%$ . Гистологический анализ показал, что в экспериментальной группе в отличие от контроля кожная мышца сохранялась жизнеспособной. При этом в одном случае из восьми наблюдалось полное приживление кожного лоскута, эпидермис и дерма имели строение сходное с интактной кожей. Морфометрически установлено, что размеры раневого дефекта в экспериментальной группе на 12 сут. составляли  $5,52 \pm 4,80$  мм, в контроле –  $12,45 \pm 0,82$  мм ( $p = 0,03$ ), а на 18 сут.  $2,53 \pm 2,94$  мм, в контроле –  $4,23 \pm 3,5$  мм ( $p > 0,05$ ). В экспериментальной группе количество сосудов грануляционной ткани в центре к 18 сут. было статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой и составляло: под лоскутом  $26 \pm 2,9$ , тогда как в контроле  $20 \pm 8$ , по периферии –  $27 \pm 3,4$  и  $12,1 \pm 3,9$ , соответственно, в кожной мышце –  $21,2 \pm 3,9$  и  $12,4 \pm 3,6$  ( $p < 0,05$ ), соответственно. Генная терапия плазмидой pCMV-VEGF165 стимулирует реэпитализацию кожного дефекта и образование сосудов под аутотрансплантантом. Однако требуются дополнительные исследования для детализации и корректировки механизмов воздействия плазмиды при лечении кожных дефектов.

Финансирование исследования: *Проект финансирован грантом РФФИ (14-45-00018). Плазмида предоставлена ПАО «ИСКЧ».*

**Блинкова Н.Б.<sup>1</sup>, Данилова И.Г.<sup>1,2</sup>,  
Абидов М.Т.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Институт иммунологии и физиологии  
Уральского отделения РАН

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет  
им. первого Президента России Б.Н. Ельцина

<sup>3</sup> Институт иммунопатологии  
n.b.krohina@mail.ru

#### **МОДУЛЯЦИЯ МАКРОФАГА КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ**

Актуальность оценки морфо-функционального состояния печени при сахарном диабете (СД) обусловлена наличием инсулинзависимого механизма обмена глюкозы в гепатоцитах, участием этого ор-

гана во всех вида обмена и в инактивации 40–60% инсулина. Структурные нарушения и механизмы повреждения печени при СД у человека и животных детально описаны в работах многих исследователей. Однако регенераторные процессы в печени в условиях СД остаются недостаточно изученными. Нам представляется важной разработка направленной коррекции репаративных процессов в печени, основанная на уникальном восстановительном потенциале гепатоцитов благодаря их способности к пролиферации, полиплоидизации и внутриклеточной регенерации. На модели аллоксанового диабета у крыс исследовали регенерацию гепатоцитов в условиях активации макрофагов с использованием 3-аминофталгидрида (3-АФГ), модулирующие свойства которого проявляются в реализации противовоспалительных и антиоксидантных функций клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами Директивы Совета ЕС 2010/63, использованы 20 крыс-самцов породы Wistar массой 210–215 г. СД 1 типа смоделирован внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 300 мг /кг массы тела, 3 раза с интервалом в 1 день. Животных разделили на 4 группы: интактные ( $n = 5$ ), СД 30 сут. ( $n = 5$ ), СД 60 сут. ( $n = 5$ ) и СД 60 сут. с введением 3-АФГ ( $n = 5$ ). 3-АФГ вводили из расчета 2 мг/кг массы, 20 инъекций по схеме, внутримышечно в течение 30 сут. (начиная с 30 сут. эксперимента). Проведено морфологическое исследование образцов печени на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, иммуногистохимический анализ маркера пролиферации Ki67 (anti-humanKi-67 cloneB56; BD, США). Морфометрия выполнена с помощью программы ВидеоТест Морфология 5.2., подсчитывали количество двуядерных, полиплоидных и Ki67-позитивных гепатоцитов при увеличении микроскопа в 400 раз в 20 полях зрения каждого образца с пересчетом на  $1\text{ мм}^2$ . Для статистического анализа непараметрических выборок использовали Mann-WhitneyU-test с помощью программного обеспечения BioStatPro 5.9.8. Морфометрический анализ показал подавление регенераторных процессов в печени крыс аллоксановым диабетом, снижалась численность Ki-67-позитивных гепатоцитов, уменьшалось количество двуядерных и полиплоидных гепатоцитов. Введение 3-АФГ изменяло регенераторный потенциал гепатоцитов. Количество Ki-67-позитивных гепатоцитов достоверно увеличилось по сравнению с группой без лечения, оставаясь меньше значений интактных крыс. Низкая пролиферативная активность гепатоцитов компенсировалась значительным повышением числа двуядерных и полиплоидных клеток. Таким образом, модуляция макрофагов при аллоксановом диабете является фактором активации регенераторных процессов в печени за счет стимуляции полиплоидизации, что направлено на компенсаторное повышение функциональной активности гепатоцитов, а модулятор 3-АФГ может рассматриваться как перспективный кандидат для коррекции поражения печени.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № проекта 16-15-00039.*

**Блинова М.И., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
mira.blinova@mail.ru

### **РОЛЬ ФИБРОБЛАСТОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНОЙ ТКАНИ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАН**

Фибробласты — основной клеточный тип дермы. Дермальные фибробласты человека для лечения дефектов кожи, с использованием культивируемых *in vitro* клеток, широко используется в мире, как безопасный и эффективный метод заживления ран. Среди множества типов клеток, именно дермальные фибробласты вызывают особый интерес, поскольку играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи. Фибробласты не только формируют оптимальные условия для функционирования и пролиферации других типов клеток (эпителиальных, эндотелиальных и др.), но и отвечают за координацию их функций, в соответствии с локализацией в соответствующих тканях. Способность фибробластов формировать внеклеточный матрикс, синтезировать цитокины, факторы роста, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при повреждении кожи делает их перспективными для широкого клинического применения при повреждениях кожи для заживления ран различной этиологии.

Активное использование культивируемых *in vitro* дермальных фибробластов человека в медицинской практике в зарубежных странах стало возможным, когда было установлено, что дермальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип, имеют ограниченную продолжительность жизни, имеют низкую экспрессию антигенов гистосовместимости.

Дермальные фибробласты синтезируют целый комплекс биологически активных веществ — факторы роста, иммуностимуляторы, белки внеклеточного матрикса (различные типы коллагенов, эластин, протеогликаны и др.). Установлено что в процесс заживления также могут быть вовлечены различные факторы роста, продуцируемые фибробластами. Они регулируют рост, дифференцировку и функции эпидермальных, дермальных и иммунокомпетентных клеток, являются митогенами для кератиноцитов *in vitro*, способствуют миграции кератиноцитов.

Возможность приготовления биомедицинского клеточного продукта «Эквивалент дермальный ЭД» (дермальные фибробласты, заключенные в коллагеновый гель, — аналог дермы кожи) и использования его для заживления ран с нарушениями кожной поверхности показала, что в этих случаях эпителизация раны происходит за счет миграции собственных кератиноцитов пациента из ткани, окружающей рану, или из сохранившихся волосяных фолликулов.

Финансирование исследования: *грант РНФ № 14-50-00068.*

**Бобылёва П.И., Горностаева А.Н.,  
Андреева Е.Р.**

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН  
blastoblast@gmail.com

### **КОРОТКИЙ ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС ПОДАВЛЯЕТ ПРОДУКЦИЮ МАКРОФАГАМИ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ**

Макрофаги (МФ) являются ключевым типом клеток, вовлеченных в ремоделирование тканей при повреждении. Роль МФ в биологических процессах определяется их свойствами, которые модифицируются под действием тканевого микроокружения. В настоящее время известно о формировании полярных фенотипов МФ при модуляции их функциональной активности: провоспалительного (M1) и противовоспалительного (M2). В участках повреждения тканей формируется специфическое микроокружение, в котором реализуются функции взаимодействующих клеток. Одной из важнейших характеристик микроокружения поврежденной ткани является острый гипоксический стресс. Влияние этого фактора на участников воспалительной реакции важно для понимания процессов, происходящих в локусе повреждения. Целью данного исследования было изучение воздействия острого гипоксического стресса на свойства моноцитов/макрофагов (МН/МФ), значимых для регуляции воспалительного процесса. Моноциты (МН) были получены из общей популяции мононуклеаров периферической крови (МНК) за счёт адгезии к пластику: МНК были выделены на градиенте плотности Histopaque, после чего суспензия клеток в среде RPMI инкубировались 2 ч. в чашках Петри, затем неадгезированные клетки удалялись, и для экспериментов использовались клетки, прикрепившиеся к дну чашек Петри. Культивирование выделенных МН проводили в течение недели, это время обычно необходимо для созревания МН/МФ в монокультуре. Полученные МН/МФ подвергали короткому (24–48 ч.) гипоксическому стрессу (1% O<sub>2</sub>). Оценивали влияние гипоксического кондиционирования на экспрессию антигенов CD163, CD206, характерных для M2-МФ, и CD11b, CD68 характеризующих созревание макрофагов, методом проточной цитометрии, и по сдвигу паракринового профиля (TGF-beta, IL-6, IL-8, MCP-1), методом иммуноферментного анализа (ИФА). Практически все МН/МФ после недели культивирования и короткого гипоксического воздействия экспрессировали CD11b, HLA-DR и маркер M2-МФ CD206. Экспрессия другого маркера M2-МФ — CD163, не изменялась при культивировании и после гипоксического стресса и не превышала 25%. После 24- и 48-часового гипоксического стресса наблюдалось повышение экспрессии CD68, функция которого связана с фагоцитарной активностью и, предположительно, с процессингом/презентацией антигена. ИФА выявил снижение продукции провоспалительных цитокинов TGF-beta, IL-8 и MCP-1 под воздействием гипоксических условий. Это согласуется с полученными ранее данными об изменении экспрессии МФ ряда паракринных факторов, в т.ч. MCP-1, под воздействием гипоксических условий, при этом существует баланс продукции провоспалительных и иммуносупрессивных факторов. Таким образом, в условиях гипоксического стресса МН/МФ характеризовались промежуточным фенотипом, частично экспрессиро-

вали антигены, характерные для M2-МФ и снижали продукцию провоспалительных цитокинов.

Финансирование исследования: Грант РФФИ 17-04-00942.

**Божокин М.С.<sup>1</sup>, Божкова С.А.<sup>1</sup>,  
Нетьилько Г.И.<sup>1</sup>, Нащекина Ю.А.<sup>2</sup>,  
Наконечный Д.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

bozhokin@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА TGF-β-3 НА ХОНДРОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ММСК В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ IN VITRO И НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ДЕФЕКТА ХРЯЩА В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНО- ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ IN VIVO**

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время для восстановления структуры хрящевой поверхности стали применяться технологии связанные с использованием клеточно-инженерных конструкций (КИК).

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить в эксперименте влияние  $\text{tgf-beta-3}$  на хондрогенную дифференцировку ММСК *in vitro* и восстановление поверхностного дефекта хряща в составе клеточно-инженерной конструкции *in vivo*.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей половозрелых крыс и культивировали в среде DMEM. Для создания КИК использовали полилактидные матрицы. В эксперименте *in vitro* в опытной серии выполняли заселение матрицы культурой ММСК с последующим культивированием в среде DMEM с добавлением фактора роста  $\text{tgf-}\beta\text{-3}$ . В контрольной серии культивирование проводили в аналогичных условиях без применения фактора  $\text{tgf-}\beta\text{-3}$ . На 21 сут. проводили конфокальную микроскопию для контроля заселения матрицы, определяли относительный уровень экспрессии генов коллагена II типа и агрекана методом ПЦР. *In vivo* 12 половозрелым крысам формировали изолированный поверхностный дефект суставного хряща коленного сустава ( $h = 500$  мкм,  $d = 1200$  мкм). В область дефекта животным группы 1 имплантировали опытную КИК после обработки фактором  $\text{tgf-}\beta\text{-3}$ , группы 2 – контрольную КИК. На 90-е сут. животных выводили из эксперимента. Методом сканирующей электронной микроскопии оценивали диаметр и форму дефекта, дегенеративные изменения на поверхности дефекта и его границах.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Культивирование ММСК в присутствии фактора роста  $\text{tgf-}\beta\text{-3}$  привело к формированию хондросфер и увеличению экспрессии генов коллагена II типа и агрекана в 4 раза. В эксперименте *in vivo* использование контрольной КИК не привело к значимому изменению диаметра и формы повреждения. По окружности повреждения отмечались значительные радиальные трещины, а на границе повреждения и КИК визуализировались единичные неглубокие краевые трещины. Поверхность дефекта в данной группе была неровная с плотным содержанием и присутствием нерегулярных структур. Замещение дефекта опытной КИК привело к уменьшению диаметра повреждения на 13%. Краевых и радиальных повреждений выявлено не было, поверхность дефекта была гладкая, визуально схожая с интактным хрящом.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Применение фактора дифференцировки  $\text{tgf-}\beta\text{-3}$  *in vitro* позволило достичь увеличения экспрессии генов коллагена II типа и агрекана в 4 раза, что, по-видимому, в условиях *in vivo* проявилось в образовании более устойчивого к нагрузкам регенерата. Однако, полученные результаты требуют подтверждения гистологическими методами, которые будут выполнены в дальнейшем.

Финансирование исследования: Бюджетное финансирование.

**Бозо И.Я.<sup>1</sup>, Комлев В.С.<sup>2</sup>, Исаев А.А.<sup>1</sup>,  
Федотов А.Ю.<sup>2</sup>, Попов В.К.<sup>3</sup>, Миронов А.<sup>3</sup>,  
Дробышев А.Ю.<sup>4</sup>, Деев Р.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека»

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт металлургии

и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН

<sup>3</sup> ФГУ «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН

<sup>4</sup> Московский государственный медико-

стоматологический университет

им. А.И. Евдокимова

bozo.ilya@gmail.com

### **ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ГЕН- АКТИВИРОВАННЫЕ ИМПЛАНТАТЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПЕРВОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

Для эффективного лечения пациентов с протяженными дефектами костей требуются такие остеопластические материалы, которые одновременно обладали бы оптимальными остеокондуктивными свойствами, точно соответствовали по форме и размерам замещаемому дефекту и содержали биологически активные компоненты, индуцирующие репаративный остеогенез. С учетом этих принципов, уже разработаны различные варианты персонализированных тканеинженерных и содержащих факторы роста изделий, изготовленных с использованием технологии трехмерной печати. Однако известные недостатки указанных подходов препятствуют решению клинической проблемы. В этой связи, основываясь на успешных результатах исследований стандартизированных ген-активированных материалов и трехмерной печати матриц на основе октакальциевого фосфата (ОКФ), мы разработали оригинальную технологию изготовления персонализированных ген-активированных имплантатов, состоящих из ОКФ и плазмидной ДНК, несущей терапевтический ген(ы), в частности, ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [Патент РФ № 2597786]. Исследование было выполнено на свиньях-самцах средней массой  $50 \pm 2$  кг ( $n = 4$ ). Каждому животному по данным мультиспиральной КТ планировались дефекты большеберцовых костей правых задних конечностей с полным прерыванием и тела нижней челюсти в области углов с обеих сторон с сохранением непрерывности. Дефекты длинных трубчатых костей имели общую протяженность 30 мм, центральная часть которых длиной 10 мм соответствовала диаметру кости, а две периферические размерами  $10 \times 5 \times 5$  мм формировали краевые дефекты. Дефекты нижней челюсти имели размеры  $25 \times 15 \times 10$  мм, а по ширине соответствовали кости. С использованием технологии трехмерной печати были изготовлены матрицы-носители из ОКФ, точно соответствующие форме и размерам запланированных дефектов, изделия стерилизовались гамма-облучением и по ори-



гинальной технологии подвергались объединению с плазмидной ДНК, несущей ген VEGF. Персонализированные блоки ген-активированных материалов имплантировали животным под наркозом, в качестве контроля служили блоки из ОКФ, которые использовали только для реконструкции нижней челюсти слева. В ходе имплантации осуществляли остеосинтез с использованием реконструктивной пластины для большеберцовой кости и минипластин для нижней челюсти. Результаты оценивали по данным КТ и гистологического исследования через 3 и 6 мес. после операции. По данным КТ, на всех сроках наблюдения костные дефекты не определялись, были заполнены регенератом высокой плотности и интегрированными с костными стенками имплантатами. Гистологическое исследование подтвердило заполнение дефектов костным регенератом, окружающим фрагменты блоков без соединительнотканной капсулы. Определялся гипертрофический периостальный костный регенерат, частичная фрагментация имплантатов. Таким образом, первичные данные свидетельствуют об эффективности разработанных персонализированных ген-активированных материалов в реконструкции костей скелета, однако требуются дополнительные исследования и оптимизация способа аддитивного производства.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 15-13-00108.*

**Болдырева М.А.<sup>1,2</sup>, Белоглазова И.Б.<sup>1,2</sup>,  
Зубкова Е.С.<sup>1,2</sup>, Шевченко Е.К.<sup>1,2</sup>,  
Макаревич П.И.<sup>3</sup>, Карагаюр М.Н.<sup>3</sup>,  
Ратнер Е.И.<sup>1</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова  
mboldyreva@inbox.ru

#### **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ФАКТОРОМ РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА**

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК), являющаяся следствием диабетической макроангиопатии, особенно при сочетании с нейропатией, является частой причиной инвалидности и летальности, нанося колоссальный экономический ущерб обществу. Генная терапия с локальной экспрессией ангиогенных факторов считается наиболее перспективным подходом к нехирургическому лечению ХИНК. Одним из наиболее перспективных факторов для генной терапии ХИНК считается фактор роста гепатоцитов (HGF), обладающий ангиогенным, нейропротекторным, антиапоптотическим, антифибротическим и противовоспалительным эффектом. Ранее мы показали значительное улучшение кровоснабжения ишемизированной задней конечности мыши при плазмидной экспрессии HGF (Makarevich et al., 2012). Целью данной работы была оценка возможности стимулировать восстановление нарушенной иннервации конечности мыши с помощью локального введения плазмидной генетической конструкции, несущей ген фактора роста гепатоцитов человека (HGF). Работа выполнена на модели трав-

матического повреждения общего малоберцового нерва (*N. peroneus communis*) в результате сдавливания. Было показано, что внутримышечные инъекции плазмидной конструкции, несущей ген HGF в концентрации 200 мкг ДНК/животное, вокруг области повреждения нерва стимулируют как структурное, так и функциональное восстановление нерва. Установлено, что на 14 день после травмы амплитуда суммарного потенциала действия нерва была значительно больше в группе животных с введением плазмиды с HGF в сравнении с контрольной группой с введением пустого вектора (0,10+0,01 vs. 0,05+0,01,  $p = 0,02$ ;  $n = 9$  животных в группе), а латентный период суммарного потенциала действия нерва был значительно меньше (880+141,84 vs. 1511,43+125,27;  $p = 0,01$ ). Оценка количества неповрежденных аксонов с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов нерва дистальнее места пережатия к маркерному белку аксонов NF-H показала, что у животных, подвергшихся генной терапии HGF, оно было в 3 раза больше, чем в контрольной группе (29,5+3,76 vs. 9,17+0,5 на мм кв.;  $p < 0,001$ ). Полученные результаты показывают, что плазмидная генная терапия HGF стимулирует структурное и функциональное восстановление периферического нерва после травмы. Вместе с хорошо доказанным ангиогенным эффектом плазмидной генной терапии HGF эти результаты указывают на перспективность ее использования у больных сахарным диабетом с ХИНК и нейропатией.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФ № 16-45-03007.*

**Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Кабаков А.В.,  
Казиков О.В., Повещенко О.В., Суровцева М.А.,  
Ким И.И., Повещенко А.Ф.**

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН  
bond802888@yandex.ru

#### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СОВМЕСТНО С ЭРИТРОПОЭТИНОМ В ЛЕЧЕНИИ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС**

На сегодняшний день лечение ишемии нижних конечностей остается актуальной проблемой. Перспективным направлением в лечении данного заболевания является применение биомедицинских технологий, в том числе клеточной терапии. В связи с этим целью данного исследования стала оценка эффективности введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга без или в сочетании с эритропоэтином в экспериментальной модели критической ишемии нижних конечностей у крыс. Работа проведена на крысах-самцах породы Wistar ( $n = 48$ ). МСК получали из костного мозга бедренных костей. Критическую ишемию нижних конечностей (КИНК) у крыс модулировали перевязкой левой бедренной артерии под наркозом. Развитие ишемии, и эффект введения МСК на выраженность ишемии, фиксировали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии на лазерном анализаторе капиллярного кровотока. Состояние микроциркуляции в области стопы оценивали по следующим параметрам: показатель микроциркуляции, амплитуда медленных колебаний, амплитуда быстрых колебаний,

амплитуда пульсовых колебаний, индекс эффективности микроциркуляции. Животным, после моделирования КИНК, в мышцы голени в 5 точках вводили: 1) МСК по  $250 \times 10^3$  кл/точку (группа МСК), 2) МСК по  $250 \times 10^3$  кл/точку и эритропоэтин 6,68 МЕ/точку (Рекормон; группа МСК+ЭПО), 3) 0,9% раствор хлорида натрия (группа ФР), 4) контрольная группа без введения (группа КИНК). Животных выводили из эксперимента через 7, 14, 21 и 28 дней под наркозом. Показано, что перевязка бедренной артерии приводила к снижению показателя микроциркуляции и индекса эффективности микроциркуляции в стопе через 24 ч. по сравнению с исходными данными ( $p < 0.05$ ). В группе ФР и МСК показатель микроциркуляции в стопе достигал 30–50% от исходного уровня, но также был снижен ( $p < 0.05$ ). В то же время, в группе МСК+ЭПО показатель микроциркуляции в стопе достигал 70% от исходного уровня. Введение МСК и МСК совместно с ЭПО приводило к статистически значимому увеличению индекса эффективности микроциркуляции уже через 24 ч. по сравнению с группой КИНК и ФР ( $p < 0.05$ ). На 7 сутки после введения показатели эффективности микроциркуляции в стопе были выше в группе введения МСК+ЭПО по сравнению с другими группами, а также в группе МСК в сравнении с группой КИНК и ФР. Необходимо отметить тот факт, что лечение КИНК МСК и с добавлением ЭПО способствовало статистически значимому увеличению показателя микроциркуляции в стопе по сравнению с аналогичным параметром в контроле (КИНК) на разных сроках ( $p < 0.05$ ). Отмечено, что к концу наблюдения показатель микроциркуляции в стопе был статистически значимо выше в группе МСК+ЭПО по сравнению с другими группами. Таким образом, полученные нами данные лечения мезенхимальными стволовыми клетками без или с добавлением эритропоэтина свидетельствуют об ускорении процессов ангиогенеза на фоне экспериментальной критической ишемии нижних конечностей у крыс.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 163400076 мол\_а.*

**Бородкина А.В., Дерябин П.И., Грюкова А.А., Шатрова А.Н., Никольский Н.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
borodkina618@gmail.com

**ВОПРОС ВРЕМЕНИ: ДУАЛИЗМ ЭФФЕКТОВ АССОЦИИРОВАННОГО СО СТАРЕНИЕМ СЕКРЕТОРНОГО ФЕНОТИПА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

В последнее время появляется все больше данных о положительной роли факторов, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками (МСК), в регенерации тканей. Одновременно с этим установлено, что МСК могут подвергаться как репликативному старению после прохождения определенного количества удвоений, так и преждевременному при действии сублетальных доз стресса. Важным следствием клеточного старения является изменение профиля секретируемых факторов, получившее название ассоциированного со старением секреторного фенотипа (SASP). Считается, что именно SASP опосредует участие стареющих клеток в самых разнообразных биологических процессах, включая туморогенез, регенерацию, ремоделирование тканей,

эмбриогенез и воспаление. В этом контексте особый интерес представляют изучение состава факторов, секретируемых МСК в процессе развития старения, и оценка влияния этих факторов на нативные клетки. На первом этапе исследований был проведен сравнительный анализ состава секретомов контрольных и старых эндометриальных МСК (эМСК). В составе секретомов контрольных и старых эМСК суммарно удалось идентифицировать 892 белка, среди которых 659 были общими, тогда как 141 и 92 белка оказались уникальными для секретомов контрольных и старых эМСК, соответственно. Результаты масс-спектрометрии были дополнительно верифицированы при помощи иммуоблоттинга и иммуноферментного анализа. Установлено, что белки, секреция которых повышалась в стареющих эМСК, вовлечены в клеточную адгезию и ремоделирование внеклеточного матрикса. Далее было оценено влияние кондиционной среды, полученной от старых эМСК, на контрольные клетки. Оказалось, что культивирование нативных эМСК в такой кондиционной среде инициировало преждевременное старение. Так, были выявлены основные маркеры, характерные для старых клеток, — гипертрофия, замедление пролиферации, снижение экспрессии Ki-67, накопление в популяции SA-β-Gal-положительных клеток, повышение уровня эндогенных активных форм кислорода. Кроме того, культивирование в кондиционной среде, полученной от старых клеток, приводило к активации ответа на повреждение ДНК и индукции ATM/p53/p21 сигнального пути в контрольных эМСК. Аналогичные результаты были получены при ко-культивировании контрольных и старых эМСК. Наиболее интересной находкой данного исследования является положительный эффект временного присутствия кондиционной среды, полученной от старых клеток, на состояние нативных эМСК: наблюдалась тенденция к усилению пролиферации; увеличивалось фосфорилирование гистона H3 и экспрессия PCNA; ускорялось заживление смоделированной *in vitro* раны; уменьшался размер клеток и их автофлуоресценция; повышалась экспрессия поверхностного антигена CD146. Суммируя все полученные результаты, можно заключить, что факторы, секретируемые старыми клетками, при постоянном присутствии опосредуют распространение паракринного старения в популяции нативных эМСК, тогда как временное действие этих факторов способствует улучшению состояния контрольных клеток.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).*

**Брунчук В.А., Астрелина Т.А.,  
Усупжанова Д.Ю., Карасева Т.В.,  
Сучкова Ю.Б., Кобзева И.В., Махова А.Е.,  
Расторгуева А.А., Никитина В.А.,  
Брумберг В.А., Ломоносова Е.Е.,  
Лаук-Дубицкий С.Е., Бушманов А.Ю.,  
Самойлов А.С.**

*Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России*  
brunya2008@yandex.ru

### **СРАВНЕНИЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ У КРЫС**

**ВВЕДЕНИЕ.** Ожоги занимают второе место в структуре общего травматизма. Ожоговая травма может приводить к летальным исходам или стать причиной инвалидизации трудоспособного населения. Одним из перспективных направлений в области лечения кожных ран является применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Важнейшим преимуществом МСК является отсутствие иммуногенности. Во многих исследованиях показана способность МСК ускорять заживление ран кожи различной этиологии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Моделирование термического ожога проводили 90 белым нелинейным крысам породы Wistar мужского пола весом 200,0 г по стандартной методике паяльной станцией с площадью поражения кожи  $3,14 \pm 0,03$  см<sup>2</sup>. Лабораторные животные разделены на 3 группы по 30 крыс в каждой: контрольная группа с введением МСК костного мозга (КМ) и группа с введением МСК жировой ткани (ЖТ). Проводили интродермальное введение аллогенных МСК КМ и аутогенных МСК ЖТ в дозе 0,5 млн в день нанесения ожога. Наблюдение за животными было в течение 42 дней. Оценивали результаты с помощью гистологического исследования.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** На 3–4 сут. у всех животных формировалась ожоговая рана, покрытая плотным темно-коричневым струпом. Первые признаки эпителизации ожоговых ран в виде приподнимания края струпа появились в контрольной группе – на  $6,8 \pm 1,93$  день эксперимента, в группе МСК ЖТ – на  $6,2 \pm 0,6$ , в группе МСК КМ – на  $6,0 \pm 0,0$  сутки. Самостоятельное отторжение некротизированных тканей было зафиксировано в группе МСК КМ – на  $14 \pm 0,0$  день площадь ожоговой поверхности сократилась на 72% от исходной. Отторжение струпа в группе МСК ЖТ произошло на  $13,4 \pm 1,3$  день наблюдения, при этом площадь повреждения сократилась на 54,5%. У животных контрольной группы самостоятельное полное или сегментарное отторжение струпа произошло на  $14,1 \pm 1,66$  день исследования, процент сокращения ожоговой поверхности составил 26%. Полная эпителизация ожоговой поверхности зарегистрирована в группе с МСК КМ на  $24,3 \pm 2,5$  день, в группе с МСК ЖТ на  $29,2 \pm 3,2$  день и в контрольной группе на  $34 \pm 5,2$  день после нанесения ожоговой травмы.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** На первые сутки после моделирования ожога отмечались существенные отличия в динамике заживления ран в группах с МСК КМ и МСК ЖТ по сравнению с контрольной в виде отсутствия увеличения ожоговой поверхности. На 14 сут. после травмы в контрольной группе площадь повреждения

была больше практически в 3 раза по сравнению с группами МСК КМ и МСК ЖТ. МСК КМ и МСК ЖТ оказывают положительное влияние на регенерацию тканей при глубоких термических ожогах на модели лабораторных животных, а именно – ускоряют образование грануляционной ткани, ее созревание и эпителизацию и сокращают сроки заживления.

**Був Д.О., Емелин А.М., Жарова Е.В.,  
Деев Р.В.**

*Рязанский государственный медицинский университет*  
buev\_denis@mail.ru

### **РОЛЬ FUSION-ФЕНОМЕНА В ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕНО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ МИОПАТИЙ**

В настоящий момент в медицинской практике нет эффективных методов этиотропного и патогенетического лечения наследственных миопатий. К перспективным развивающимся методам лечения относятся технологии, позволяющие выполнить коррекцию миодистрофического фенотипа ткани путем доставки необходимых генов в пораженные мышечные волокна. К возможным способам доставки относится группа генно-клеточных методов, при реализации которых кодирующие нуклеиновые кислоты попадают в ядро «клетки реципиента» после слияния (fusion-феномен) с клеткой-вектором. Имеются указания на успешные эксперименты с использованием различных видов живых клеток. Мы исследуем процесс слияния и эффективность различных клеток-векторов для регенерации мышечной ткани. Клетки-векторы должны обладать способностью образовывать новые мышечные волокна, либо обладать способностью слияния с уже существующими мышечными волокнами. Возможным кандидатом на роль такого вектора являются: cd133(+) гемопоэтические стволовые клетки, для которых показана возможность слияния со многими клетками различных дифференоров, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, клетки с индуцированной плюрипотентностью и миобласты. В настоящее время сложно судить о том, какой именно клеточный вектор окажется наиболее эффективным. К примеру, у мезангиобластов конечная продолжительность жизни в культуре, поэтому их сложно использовать для терапии, гемопоэтические стволовые клетки не способны к рабдомиогенной дифференцировке, а миобласты не способны мигрировать через сосудистую стенку. В качестве модели в наших исследованиях мы решили использовать миобласты, несмотря на их низкую способность к миграции за пределы инъекции и плохую выживаемость клеток. Мы считаем, что данные проблемы можно преодолеть, используя различные индукторы клеточного слияния и редактирование генома. Благодаря тому, что дифференцировка и слияние миобластов с мышечными волокнами происходит в больших масштабах, а также из-за простоты культивирования *in vitro*, мы предполагаем, что миобласты являются наилучшим вариантом для вектора. В качестве индукторов слияния в наших исследованиях используются: полиэтиленгликоль, лизолецитин, моноолеат глицерин. Эффективность слияния изучается с помощью оригинального алгоритма морфометрической полуколичественной оценки

Финансирование исследования: *Внутривузовский грант от 2016 года-проект научно-исследователь-*

ской работы «Разработка метода количественной оценки fusion-феномена в культуре миогенных клеток *in vitro*».

**Буненков Н.С., Комок В.В., Сиддиков А.М., Серов Ю.А., Бабенко Е.В., Белый С.А., Немков А.С.**

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова bunenkov2006@gmail.com

### **КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИЙ КРИБАНК – НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ**

**ЦЕЛЬ.** Создать коллекцию тканей для фундаментальных и прикладных исследований. Актуальность. В настоящее время актуальной парадигмой развития медицины является трансляционная медицина, что подразумевает тесное взаимодействие специалистов разных научных направлений. Для проведения фундаментальных исследований необходим биологический материал, который может быть накоплен в криобанке.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В ПСПбГМУ им. Павлова создается криобанк тканей, полученных от кардиохирургических пациентов. В банке хранятся образцы миокарда (фрагменты ушек предсердий) и плазма крови, взятая до операции и сразу после завершения. Образец ткани сразу же после взятия помещают в жидкий азот или холодильник при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Каждому образцу со штрих-кодом соответствует специальным образом закодированная информация о пациенте, которая включает в себя лабораторные, инструментальные и клинические данные, таким образом, чтобы обеспечить конфиденциальность пациентов и точную идентификацию образцов. Получение и хранение биологического материала одобрено на проблемных комиссиях ПСПбГМУ и локальными этическим комитетом.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Получены образцы ушек предсердий от 50 кардиохирургических пациентов, образцы плазмы от 170 пациентов, в базу данных внесены лабораторные, инструментальные и клинические данные по 170 пациентам, перенесшим кардиохирургические операции. База данных пациентов, материал которых хранится в криобанке, используется в клиническом исследовании по оценке ишемически-реперфузионного повреждения миокарда при различных типах кардиохирургических операций AMIRI-SABG 03/17-11 (идентификатор в международном регистре ClinicalTrials.gov NCT03050489) выполнена всесторонняя сравнительная оценка ишемически-реперфузионного повреждения миокарда по лабораторным, инструментальным и клиническим показателям в двух группах пациентов: с искусственным кровообращением и на работающем сердце.

**ВЫВОДЫ.** Криобанк тканей позволяет обеспечить материалом подразделения, выполняющие молекулярно-биологические исследования, что в сочетании с результатами инструментальных исследований и клиническими данными позволяет обеспечить высокое качество, достоверность и проверяемость полученных результатов. Криобанк существенно экономит время, т.к. врачи и ученые сразу получают готовый массив данных, что значительно ускоряет создание больших выборок пациентов в рамках исследований, выполняемых на клинических базах. При появлении новых технологий диагностики и тест – систем, кри-

обанк позволяет получить доступ ко всему массиву материала и данным, а также сравнить результаты разных методов диагностики на одной выборке пациентов, что обеспечивает стандартизацию.

Финансирование исследования: Грант по теме государственного задания «Совершенствование методов хирургического лечения ИБС с применением клеточных технологий. (Кардиология и ангиология)» № 115091630053.

**Буненков Н.С., Канунников М.М., Комок В.В., Голенко Д.Д., Муслимов А.Р., Лепик К.В., Сергеев В.С., Галибин О.В., Немков А.С.**

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова bunenkov2006@gmail.com

### **ОЦЕНКА ХОУМИНГА АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРОЛИКОВ**

**ЦЕЛЬ.** Оценить способность к хоумингу внутривенно введенных мезенхимальных стволовых клеток на модели острого инфаркта миокарда у кроликов. Актуальность. Несмотря на развитие кардиохирургии, остается категория пациентов с диффузным коронарным атеросклерозом, которым не может быть выполнена хирургическая операция, а медикаментозная терапия неэффективна. Для таких пациентов одним из методов лечения может быть клеточная терапия. Ряд клинических исследований выявил как положительные результаты клеточной терапии, так и отсутствие эффекта, что связывают с жизнеспособностью и функциональной активностью клеток. Таким образом актуальной задачей является оценить хоуминг аутологичных мезенхимальных клеток, введенных внутривенно.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальная работа выполнена на двух группах кроликов с инфарктом миокарда и без инфаркта миокарда (контрольная группа). В каждой группе по 3 животных. Под внутривенным наркозом выполнялась пункция подвздошной кости, получали 5 мл костного мозга, который отправляли в лабораторию клеточных технологий НИИ ДОГиТ для получения культуры мезенхимальных стволовых клеток, несущих магнитные капсулы с флуоресцентным красителем. На этом этапе операция для кроликов из контрольной группы заканчивалась. После получения костного мозга выполняли торакотомию и перевязывали переднюю межжелудочковую артерию. Получение инфаркта миокарда регистрировали по элевации сегмента ST. Стволовые клетки культивировали с магнитными микрокапсулами, несущими флуоресцентный краситель. Мезенхимальные стволовые клетки поглотившие магнитные капсулы с флуоресцентным красителем отделяли от клеток, не поглотивших капсулы с помощью магнитного сортирования. Через месяц после инфаркта миокарда, меченые мезенхимальные стволовые клетки вводили в количестве 5 млн в ушную вену кроликам с инфарктом миокарда и из контрольной группы. Затем через месяц после введения стволовых клеток, кроликов выводили из эксперимента, извлекали сердце, а также паренхиматозные органы (почки, печень, легкие). Сердца и паренхиматозные органы изучали с помощью конфокальной микроскопии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано значительное накопление флуоресцентного красителя в перинфарктной зоне миокарда. Накопление флуоресцентной метки в па-

ренхиматозных органах практически отсутствовало или было незначительным. В контрольной группе накопление флюоресцентной метки в паренхиматозных органах и сердце практически отсутствовало или было незначительным.

**ВЫВОДЫ.** Показан хоуминг аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в периинфарктную зону сердца в значительно большем количестве, чем в паренхиматозные органы или в здоровое сердце.

Финансирование исследования: *Тема государственного задания ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, грант № 115091630019 «Оценка применения аутологичных стволовых клеток для регенеративной терапии у больных с дилатационной и ишемической кардиомиопатией».*

**Нагибович О.А., Пелешок С.А.,  
Бунтовская А.С., Елисеева М.И.**

*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова  
buntovskayaa@mail.ru*

### **КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ**

В результате более чем 30-летних исследований в области применения клеточных технологий появился широкий ассортимент средств для регенеративной терапии повреждений кожи, начиная от децеллюлированных конструкций и бесклеточных коллагеновых матриц до многослойных аналогов кожи. Целью исследования явился анализ существующих на рынке биомедицинских клеточных продуктов для лечения ран и ожогов. Аутологичные продукты не вызывают иммунного ответа, в том числе аллергические реакции, однако их производство требует определенного времени для взятия и наращивания биологического материала. Аллогенные продукты можно культивировать заранее в необходимом количестве и хранить в медицинском учреждении. В результате проведенного поиска среди коммерческих продуктов для лечения ран и дефектов кожи, доступных на рынке или находящиеся в стадии разработки, было выявлено 47 клеточных продуктов разных стран и компаний, которые по составу можно классифицировать на дермальные, эпидермальные и композиты. Проведенный анализ показал, что основой для формулы коммерческого продукта при лечении ран являются эпидермальные заменители (36,2%), содержащие дифференцированные клетки кожи человека (кератиноциты). Не менее популярным стало использование двухслойных композитов, являющихся частично полноценными заменителями кожи и состоящих из дермального (фибробластов) и эпидермального (кератиноцитов) компонентов (34,0%). Удельный вес продуктов содержащих только фибробласты (дерму) составил 19,1%. 10,6% клеточных продуктов имели в составе стволовые клетки различного происхождения. Перспективными являются препараты, не требующие предварительного культивирования или культивируемые непродолжительное время, получаемые из аутологичных клеток пациента. Изготовление препарата ReCell® (ClinicalCellCulture, Великобритания) занимает всего 30 мин. Он представляет собой суспензию аутогенных кератиноцитов, наносимых на обнаженную дерму, для лечения длительно незаживающих ран, ожогов и витилиго. Препарат CellSpray® XP (AvitaMedicalLtd, Австралия) также предназначен для экстренного заживления повреждений кожного покрова от 30 до 90%, кото-

рый состоит из аутологичных эпителиальных клеток. Время его изготовления 48 ч. Прогрессивная технология в клеточной терапии ран, применяемая компанией RenovaCareInc. Ее суть состоит в выделении аутологичных стволовых клеток кожи с помощью системы CellMist™ и далее в особом, щадящем распылении их над пораженной поверхностью при помощи устройства SkinGun™. Технология позволяет провести все манипуляции в течение 90 мин. Для осуществления этой технологии используется пневматическое устройство с электронным управлением, которое не повреждает клетки, за счет этого 97,3% клеток остаются жизнеспособными после пересадки. Данный препарат до сих пор находится в стадии испытаний и недоступен для коммерческого использования. Таким образом, биомедицинские клеточные продукты широко используются в лечении повреждений кожи, однако «золотого стандарта» на сегодняшний день нет.

**Бурда С.Ю.<sup>1</sup>, Сарычева М.В.<sup>2</sup>, Анпилова А.Э.<sup>2</sup>,  
Бурда Ю.Е.<sup>2</sup>, Надеждин С.В.<sup>2</sup>,  
Покровский М.В.<sup>2</sup>, Куликовский В.Ф.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО «Курский государственный  
медицинский университет»*

<sup>2</sup> *ФГАУ ВО «Белгородский государственный  
национальный исследовательский университет»  
burda@bsu.edu.ru*

### **РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПСОРИАЗА У КРЫС ЛИНИИ W1STAR**

Для подтверждения эффективности новых лекарственных препаратов или биомедицинских клеточных продуктов необходимо исследование на модели заболевания у нескольких видов животных. Однако выясняется, что перечень моделей кожных болезней сильно ограничен: контактно-аллергический и атопический дерматит у мышей, крыс, морских свинок, а также некоторое количество других моделей, разработанных на генетически модифицированных животных, мало доступных отечественным исследователям (L.S. Chanetal, 2004; T. Zolneret al., 2005). Что касается существующих моделей псориаза, использовали преимущественно трансгенные линии мышей (Hak-Ling Maet al., 2008), и лишь недавно разработана модель имихимод-индуцированного псориазiformного повреждения кожи у мышей линии BALB/c и C57BL/6 (L.v.d. Fitset al., 2009). Целью настоящего исследования стала разработка модели псориазiformного поражения кожи у крыс линии Wistar. В качестве индуктора в начале исследования использовали 3% суспензию имихимода в оливковом масле с добавлением 30% ДМСО, которую наносили в количестве 200 мкл на предварительно депилированную кожу верхней половины спины. Уже на 2-е сут. развивалось воспаление, характеризовавшееся гиперемией, отеком кожи и появлением участков шелушения, а к 3-м суткам данная реакция достигала максимальной выраженности. При этом у части животных наряду с выраженной гиперемией и отеком отмечалось появление пустулезной сыпи с образованием серозно-гнойных корочек, развивались явления общей интоксикации. Из 15 животных (10 самцов и 5 самок, массой от 184 до 256 г.), наиболее выраженное воспаление развилось только в группе самцов, у 6 из 10 животных. В группе самок у 2 особей воспаление носило минимальный характер, с явлением легкой гиперемии кожи, без

заметного отека и без шелушения, у остальных 3 самок развилось умеренное воспаление, без явлений общей интоксикации. В связи с этим было принято решение повторить исследование с 1% суспензией имихимода в оливковом масле с 10% ДМСО. В опыт были включены 6 самцов и 6 самок, массой от 212 до 264 г. Признаки выраженного воспаления, но без образования пустул и гнойных корок, отмечались на 4 сут. В группе самцов явления гиперемии, умеренного отека и шелушения отмечены у всех животных, в группе самок у 2 животных признаков воспаления к 4-м сут. не было отмечено, у 2 животных оно носило минимальный характер, и у 2 его выраженность не отличалась от группы самцов. Значительных явлений общей интоксикации в обеих группах не выявлено. Псориазоподобные изменения кожи животных в зоне выраженного воспаления, с утолщением и разрыхлением эпидермиса, формированием внутрикожных полиморфноклеточных инфильтратов, усилением акантоза, были подтверждены гистологически. Таким образом, ежедневные аппликации 1% суспензии имихимода в оливковом масле с добавлением 10% ДМСО на кожу спины самцов у крыс линии Wistar приводят к стабильно воспроизводимому развитию псориазиформного воспаления.

Финансирование исследования: Средства НИУ «БелГУ», инициативное исследование.

**Бурда Ю.Е.<sup>1</sup>, Надеждин С.В.<sup>2</sup>, Зубарева Е.В.<sup>2</sup>,  
Покровский М.В.<sup>2</sup>, Куликовский В.Ф.<sup>2</sup>,  
Бурда С.Ю.<sup>3</sup>, Ширина М.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ООО «Инновационный центр «Бирюч-НТ»

<sup>2</sup> НИУ «Белгородский государственный университет»

<sup>3</sup> Курский государственный медицинский университет

yu.burda@brc.efko.ru

### **ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРАТИВНЫХ И РЕГЕНЕРАТОРНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Сегодня популярным вектором в клеточной биологии становятся исследования о возможности практического применения в медицине биологически активных веществ, полученных в ходе культивирования эукариотических клеток. В связи с этим изучение влияния таких клеточных продуктов на процессы восстановления структурных элементов и течение репаративной регенерации дермы после ее повреждения представляют определенный интерес для регенеративной медицины и косметологии. В исследовании использованы мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из красного костного мозга крысы. Нарращивание биомассы осуществляли с использованием питательной среды DMEM с 10% ЭТС и антибиотиками, для получения биологически активных веществ использовали питательную среду DMEM/F12 без сыворотки. Клетки культивировали в присутствии 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C в течение 120 ч. Концентрирование среды проводили в вакуумном испарителе Rotavapor-210 (BUCHI, Швейцария), перед дальнейшим применением концентрат подвергали стерилизации через фильтры из ацетата целлюлозы с порами 0,22 мкм. В дальнейшем работа была выполнена на 6 крысах самцах линии Wistar. Животным под эфирным наркозом, после удаления шерсти на спине, пробойником

делались полнослойные кожные раны диаметром 8 мм. Одну из них после гемостаза заклеивали клеем медицинским БФ-6, вторую и третью заполняли, соответственно, гелем на основе агарозы чистой или содержащей биологически активные вещества клеточного происхождения. Поверх геля наносили клей БФ-6. Продолжительность эксперимента составляла 14 дней. Макро- и микроскопически оценивали состояние кожных покровов в зоне оперативного вмешательства, включая гистологию. Макроскопическое исследование выявило быстрое уменьшение диаметров зон дефекта – лунок, куда был добавлен гель с биологически активными веществами клеточного происхождения. В этих зонах отсутствовали признаки воспаления, дегенеративных и некротических изменений, структура плотной волокнистой соединительной ткани выглядит более оформленной, здесь коллагеновые волокна имеют более упорядоченное расположение среди клеточных элементов преобладают фибробласты. Структура плотной волокнистой соединительной ткани в зоне дефекта с добавлением чистого геля носила более рыхлый и неупорядоченный характер, встречались различные типы клеток: лимфоциты, фибробласты, макрофаги. В ходе исследования было установлено, что при культивировании в стандартных флаконах и чашках Петри из МСК костного мозга можно получить биологически активные вещества в достаточной концентрации для стимулирования восстановления структурных элементов (регенераторный процесс) ткани и обеспечения эффективного течения регенерации ткани после ее повреждения. Активация, течение и исход репаративной регенерации кожных покровов происходит за счет активизации деятельности фибробластов биологически активными веществами. Таким образом, полученные в ходе настоящей работы биологически активные вещества можно использовать для стимуляции регенерации кожных покровов.

Финансирование исследования: Средства НИУ «Белгородский государственный университет» – инициативное исследование

**Бурматова А.Ю.**

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

alex.burmatova@mail.ru

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА РОСТА TGF-SS ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СПИЦ С НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ ПОКРЫТИЯМИ В ОСТЕОПОРОТИЧЕСКУЮ КОСТЬ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что чрескостный остеосинтез (ЧОС) в условиях иммобилизационного остеопороза (ИОП) не всегда дает желаемый результат (Гольназарова С.В., 2014), поэтому актуальным является поиск способов обеспечения остеоиндуктивности спиц для ЧОС. В эксперименте по заполнению костных дефектов было показано, что наноструктурированные углеродные покрытия обладают остеоиндуктивными свойствами, детерминированными топографией наноструктурированной поверхности и химическим составом (a-C и CNO<sub>25</sub>) (Макарова Э.Б., 2013). Трансформирующий фактор роста β (TGF-β) – один из важнейших регуляторов остеогенеза, экспрессируемый остеогенными клетками, преимущественно остеобластами, активирующий их пролиферацию и дифференцировку (Linkhart T.A., 1996).

В связи с этим, представляет интерес изучение его динамики при имплантации спиц с различными наноструктурированными углеродными покрытиями в условиях ИОП, что явилось целью настоящей работы.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперимент по моделированию ИОП проведен на крысах-самцах линии Вистар, которым ампутировали кости голени задней конечности. На 90 сут. иммобилизации (период формирования ИОП) в бедренную и большеберцовую кости имплантировали спицы с наноуглеродным CNO<sub>2,5</sub> покрытием, дотированным атомами азота (1 группа животных), животным 2 группы имплантировали спицы с наноуглеродным алмазоподобным а-С покрытием. До имплантации спиц, а также на 14, 30, 60 сут. после нее в сыворотке крови определяли концентрацию TGF-β.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При имплантации спиц с различными покрытиями динамика уровня TGF-β различалась. В группе с CNO<sub>2,5</sub> — покрытием пик концентрации наблюдали к 30-м сут.: уровень TGF-β вырос в 1,5 раза относительно уровня до имплантации, а к 60-м сут. снизился в 1,9 раза. В группе с а-С — покрытием максимальный уровень TGF-β — на 14 сут.: в 1,5 раза выше чем до имплантации, к 30-м сут. — снижен в 1,4 раза, а к 60-м вновь возрос в 1,1 раза. Таким образом, на 60-е сут. после имплантации уровень TGF-β более высокий ( $p \leq 0,01$ ) в группе с а-С — покрытием в 1,6 раза.

**ВЫВОДЫ.** Полученные результаты, вероятно, обусловлены различной адгезией клеток и компонентов экстрацеллюлярного матрикса к различным наноструктурированным поверхностям спиц, что, соответственно, сопровождается различными механизмами внутриклеточной сигнализации.

**Бухарова Т.Б.<sup>1</sup>, Леонов Г.Е.<sup>1</sup>, Васильев А.В.<sup>2</sup>,  
Кузнецова В.С.<sup>2</sup>, Галицына Е.В.<sup>1</sup>,  
Загоскин Ю.Д.<sup>3</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>3</sup>, Чвалун С.Н.<sup>3</sup>,  
Гольдштейн Д.В.<sup>1</sup>, Кулаков А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

<sup>2</sup> ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии»

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт»  
bukharova-rmt@yandex.ru

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ В МОДЕЛИ IN VITRO**

**ВВЕДЕНИЕ.** Полимеры молочной кислоты (полилактиды) являются компонентами многих биосовместимых материалов и широко применяются в составе матриц носителей для клеток в тканевой инженерии. Однако матриксные свойства полилактидных материалов могут существенно варьировать в зависимости от молекулярной массы полимера, его надмолекулярной структуры и других физико-химических характеристик. Выбор полилактидов с оптимальными характеристиками — важная задача, направленная на повышение биосовместимости материалов для тканевой инженерии и улучшения их приживляемости при трансплантации.

**ЦЕЛЮЮ** настоящей работы является сравнение цитотоксичности и способности к поддержанию клеточной адгезии 7 материалов, полученных из полилактидов различного состава.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Образцы получали из поли-L поли-D лактидов различной молекулярной

массы (от 40 до 249 кДа) методом классической сублимационной сушки (лиофилизации), которая включает в себя этапы охлаждения (с последующей заморозкой) образцов и последующего испарения льда при низком давлении. Для оценки цитотоксичности предварительно стерилизованные образцы инкубировали в среде в течение 1 и 7 сут. при 37°C и проводили МТТ-тест по стандартной методике с использованием мультипотентных стромальных клеток (МСК) жировой ткани. Для оценки плотности расположения клеток на поверхности материалов на 1 и 7 сут. использовали витальный флуоресцентный краситель РКН-26 в соответствии с методикой производителя.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Были получены полилактидные образцы с пористой ячеистой структурой. Размер пор составлял 2–50 мкм, пористость — 95%. С помощью МТТ-теста было показано, что ни один из образцов не оказывает цитотоксического действия на культуры МСК. Данные флуоресцентной микроскопии показали, что клетки культур МСК более плотно располагаются на поверхности поли-L лактидов, при этом наиболее предпочтительны полимеры с относительно более высокой молекулярной массой — от 100 до 200 кДа. Выбранные в ходе исследования полилактиды могут быть использованы как компоненты композитных остеопластических материалов, в том числе в составе термоотверждаемых гидрогелей, в качестве наполнителей, импрегнированных остеиндуцирующими факторами с целью обеспечения контролируемого высвобождения таких факторов в окружающие ткани в заданные сроки для максимального терапевтического эффекта. Варьирование молекулярных характеристик полилактида позволит настраивать время выхода остеиндуктора, а также прочностные свойства композиционного материала.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-00298.*

**Ваза А.Ю., Боровкова Н.В., Макаров М.С.,  
Файн А.М., Пономарев И.Н.**

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского  
vazal@inbox.ru

### **СТИМУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА ИНЪЕКЦИОННОЙ ФОРМОЙ ТРАНСПЛАНТАТА ИЗ КОЛЛАГЕНА 1 ТИПА И БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**ЦЕЛЬ.** Оценить влияние комбинированного биотрансплантата на основе раствора коллагена I типа и богатой тромбоцитами плазмы на остеогенез.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Проведен эксперимент на 60 беспородных крысах. В наружном мышечном бедре крысы во фронтальной плоскости сверлом формировали костный дефект диаметром 2,0 мм глубиной до противоположного кортикального слоя. В первой (контрольной группе, 20 крыс) дефект не заполняли. Во второй группе (n = 20) дефект заполняли 5% раствором аллогенного (крысиного) коллагена. В третьей группе (n = 20) дефект заполняли смесью аллогенного коллагена 1 типа и крысиной богатой тромбоцитами плазмой (кБоТП) в соотношении 1:1. Крыс выводили из эксперимента на 7, 14, 28, 84 сутки по 5 животных из каждой группы. Процесс восстановления кости в области дефекта анализировали в динамике макроскопически и на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** На 7 сутки после операции у животных первой и второй групп по краям дефекта отмечена интенсивная инфильтрация клетками воспаления, рост костных трабекул слабый. У животных третьей группы по краям дефекта степень инфильтрации клетками воспаления менее выражена и наблюдался интенсивный рост костных трабекул. Через 14 сут. в контрольной группе при гистологическом исследовании мышечелков бедра крыс наблюдали рост и утолщение костных балок, хотя число остеобластов в их составе и степень базофилии были заметно меньше (т.е. степень интенсивности белкового синтеза ниже), чем в группе лечения коллагеном и кБоТП на 7 сут. На 14 сут. в группе лечения коллагеном значительная область дефекта (75%) была заполнена слабо пигментированными костными трабекулами, клетки воспаления отсутствовали, наблюдалась интенсивная миграция фибробластов и остеобластов. В группе лечения коллагеном и кБоТП у всех обследованных животных область дефекта была практически неразличима на гистологических препаратах: на месте дефекта сформировалась полноценная трабекулярная костная ткань. Через 28 сут. в опытных группах трабекулярная структура кости восстановилась полностью, а в контрольной группе на 80%. При этом во всех случаях макроскопически дефекты кости не видны. На 84 сут. у животных всех групп отмечено полное восстановление структурной целостности костной ткани.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Применение кБоТП снижает интенсивность воспалительной реакции в зоне дефекта кости у крыс. Использование кБоТП в комбинации с коллагеном позволяет сократить время репарации костного дефекта у крыс. В ходе эксперимента получены благоприятные результаты, которые дают основание для продолжения изучения влияния комбинации аутогенной БоТП и инъекционной формы аллогенного коллагена на костную регенерацию у человека.

**Вайпан Д.В.<sup>1</sup>, Пеньков Д.Н.<sup>2</sup>, Григорьев А.П.<sup>3</sup>, Ткачук В.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

<sup>3</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова  
fenek2004@yandex.ru

### **ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ PREP1 И RBX1 В МЕЗЭНТОДЕРМАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Pre-B-celulleukemiahomeobox 1 (PBX1) и RBX-regulatingprotein 1 (PREP1) относятся к классу TALE гомеодоменных транскрипционных факторов и являются функциональными партнерами друг друга. Известно, что эти факторы стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), и потому имеют принципиальное значение в процессах раннего эмбрионального развития, адипогенеза и онкогенеза. Так, отсутствие PREP1 приводит к нарушению формирования всех зародышевых листков и гибели мышечных эмбрионов на стадии гастрюляции. PREP1 и RBX1 являются также одними из ключевых регуляторов адипогенеза, по-разному действуя на раннюю и терминальную стадии этого процесса. Кроме того,

PREP1 является онкосупрессором: так, его дефицит ведёт к возникновению некоторых опухолей, в частности лимфом и лейкозиев. На основании этого нами было предположено, что транскрипционные факторы PREP1 и RBX1, действуя в комплексе либо независимо, стимулируют переход стволовых клеток из плюрипотентного в мультипотентное состояние и блокируют выход из него. Нами была смоделирована *in vitro* мезэнтодермальная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК) — модель, отражающая ранние этапы эмбриогенеза (гастрюляцию и ЭМП), на примере спонтанной дифференцировки в линии клеток дикого типа и нокаут-ов по гену *Prep1* (*Prep1*<sup>-/-</sup>). Кроме того, было показано, что в отсутствие PREP1 его партнер RBX1 подвергается протеолитической деградации. Поэтому нами была также получена линия мЭСК с искусственно восстановленным уровнем белка RBX1 из линии *Prep1*<sup>-/-</sup> (*Pbx1* rescue). В результате в этих линиях нами была оценена экспрессия маркеров плюрипотентности и мезэнтодермальной дифференцировки. Было обнаружено, что экспрессия маркеров мезэнтодермы и первичной мезодермы угнетена в *Prep1*<sup>-/-</sup> и *Pbx1*-rescue линиях мЭСК по сравнению с клетками дикого типа на ранних этапах мезэнтодермальной дифференцировки, в то время как уровень экспрессии маркеров плюрипотентности оказался в нокаутных линиях несколько выше, чем в клетках дикого типа. При этом, восстановление уровня белка RBX1 не влияло на паттерны экспрессии маркеров мезэнтодермы и плюрипотентности в *Prep1*<sup>-/-</sup> мЭСК. Таким образом, нами было показано, что транскрипционный фактор PREP1, действуя в одиночку и/или в комплексе с RBX1, стимулирует мезэнтодермальную дифференцировку ЭСК за счёт воздействия на эпителиально-мезенхимальный переход.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00026): «Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: выяснение молекулярных механизмов, ключевых сигнальных путей и транскрипционных факторов с целью определения биомаркеров для новых лекарственных средств».*

**Валетдинова К.Р.<sup>1,2,3,4</sup>, Овечкина В.С.<sup>4</sup>, Григорьева Е.В.<sup>1,2,3,4</sup>, Маретина М.А.<sup>5,6</sup>, Киселев А.В.<sup>5</sup>, Баранов В.С.<sup>5,6</sup>, Медведев С.П.<sup>1,2,3,4</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>4</sup> Новосибирский национальный

исследовательский государственный университет

<sup>5</sup> НИИ акушерства, гинекологии

и репродуктологии им. Д.О. Отта

<sup>6</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

kamila23@list.ru

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ**

Крайне актуальной на сегодняшний день задачей является разработка новых способов терапии спинальной мышечной атрофии (СМА), поскольку



существующие методы обеспечивают лишь временное поддержание жизни пациентов. Поскольку данное заболевание является наследственным и обусловлено известной мутацией в гене SMN1, то перспективным подходом является генная терапия. В последние годы появился новейший инструмент — система CRISPR/Cas9, с помощью которой можно редактировать геном плюрипотентных и дифференцированных клеток пациента с наследственным заболеванием таким образом, чтобы исправить имеющуюся мутацию. Кроме того в настоящее время активно развивается направление, основанное на получении клеточных моделей SMA с помощью дифференцированных производных пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Моторные нейроны, дифференцированные из ИПСК и воспроизводящие фенотип данного заболевания, могут быть использованы в исследованиях патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели двигательных нейронов, для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики лечения SMA. В данной работе была получена и охарактеризована новая модельная система SMA, состоящая из пациент-специфичных клеток больных SMA I, II типа и здорового человека. Изучен и оценен статус плюрипотентности клеточных линий, полученных в результате репрограммирования фибробластов, в системе *in vitro*. Доказано, что полученные культуры являются плюрипотентными стволовыми клетками и имеют соответствующую морфологию, характерный профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании самообновления и плюрипотентности, а также несут признаки генетических aberrаций, связываемых с развитием спинальной мышечной атрофии. Доказано, что спектр дифференцированных производных, полученных в результате спонтанной дифференцировки индуцированных клеточных линий, представлен производными трех зародышевых листков — экто-, эндо- и мезодермы. Проведена направленная дифференцировка полученных культур в моторные нейроны. Показана экспрессия основных маркеров данного типа клеток: SOX1, PAX6, OLIG2, SYNI, HB9, ISL1, NF200, TUJ1, MAP2, CHAT. Показано, что нейроны, полученные от пациента со SMA II типа, обладают более выраженной спонтанной активностью и более деполяризованы в покое, чем нейроны контрольной линии. Клеточная модельная система SMA, полученная в данной работе, является удобным объектом для тестирования и оценки эффектов использования CRISPR/Cas9-опосредованной коррекции мутации в гене SMN2. В ходе дифференцировки ИПСК проходят несколько стадий от нейрорепитериальных предшественников до зрелых двигательных нейронов, которые воспроизводят основные стадии развития данного типа нервных клеток в онтогенезе человека. Таким образом, можно моделировать и оценивать эффекты коррекции мутаций в разных типах клеток, то есть на разных стадиях развития заболевания.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ № 17-75-10041 «Разработка высокоэффективных молекулярно-генетических подходов для коррекции спинальной мышечной атрофии».*

### **Вархотов Т.А.**

*МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Философский факультет  
varkhotov@gmail.com*

### **НАЦИОНАЛЬНЫЙ БАНК-ДЕПОЗИТАРИЙ ЖИВЫХ СИСТЕМ: НОРМАТИВНО-ЭПИСТЕМИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ И ПРОБЛЕМЫ СОЦИАЛЬНО-ГУМАНИТАРНОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ**

Проект создания национального банка-депозитария живых систем (далее — Биобанк), реализуемый на базе МГУ, представляет собой выдающийся пример тех возможностей и, одновременно, проблем, которые открываются на современном этапе развития науки и техники, стремительно срастающихся между собой и с системами социального управления. Российский проект имеет беспрецедентные по масштабу задачи и уникальные внешние условия формирования: практически полное отсутствие аналогов и социальной инфраструктуры (нормально-правовое регулирование, сложившаяся система рецепции на уровне «общественного мнения» и т.д.) внутри страны. При этом опыт развития биобанкинга за рубежом имеет ограниченное значение ввиду высокой культурной и правовой специфичности России. Проект разработки Биобанка может казаться ценностно-нейтральной задачей инженерного типа. Биобанк представляет собой хранилище, и в этом качестве, на первый взгляд, ставит перед разработчиками исключительно технические задачи: оптимальный выбор оборудования, экономическое планирование комплектования и амортизации материальной инфраструктуры и т.п. Вопросы использования хранилища представляются вопросами «второго шага», возникающими только на стадии использования уже созданного биобанка. На практике не существует ценностно-нейтральных решений в области материальных практик, всегда включающих и социально-инженерную компоненту. Такой взгляд раскрывает в проекте Биобанка нормативно-эпистемическое измерение: имплицитную систему нормативных установок, регулирующих, в равной мере, и принципы организации системы, и моральные добродетели ее участников. Яркий пример — разработка модели информированного согласия для Биобанка — юридического документа, регулирующего отношения организации с донором по поводу переданных им биологических материалов. Информированное согласие предполагает осознанный и добровольный характер передачи донором собственных биоматериалов. Зарубежная практика исходит из необходимости относительно полного информирования донора о возможных вариантах использования его биоматериалов и моральной приемлемости этой ситуации для донора («информированное» и «согласие»). Такая практика может быть реализована только в условиях профилированности биобанка и ясности относительно целей и политики дальнейшего использования образцов. Альтернативный сценарий предполагает «универсальное» согласие, когда донор просто отчуждает образцы, соглашаясь с любым возможным сценарием их использования. Такое решение вовсе не является «морально нейтральным»: этим решением мы формируем установку бесправия и социальной пассивности у потенциального донора и установку безответственности и всевластия

у потенциального пользователя. Распорядиться этими установками можно по-разному, но связанные с ними социальные риски требуют оценки.

**Василевская Е.Р., Федулова Л.В.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова»  
rina715@yandex.ru

**ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ БИОМОЛЕКУЛЫ – СТИМУЛЯТОРЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ИММУННЫХ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ**

Иммунодефицитные состояния различного генеза сопровождаются деструктивными изменениями в центральных и периферических органах системы иммунитета, проявляющимися инволюцией тимуса, уменьшением числа функциональных элементов селезенки и лимфатических узлов, дистрофическими изменениями печени. Воспроизведение *in vivo* иммунодепрессивных цитостатик-индуцированных реакций приводит к стойким нарушениям дифференцировки стволовых клеток в зрелые клеточные формы лимфоидного ряда, расстройствам регуляции и рецепции регуляторных воздействий иммунных клеток, что характеризуется увеличением содержания гранулоцитов, уменьшением числа Т- и В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup>), активности NK-клеток, нарушением экспрессии цитокинов. Целью работы являлось изучение терапевтического потенциала тканеспецифичных биомолекул на модели иммунодефицита *in vivo*. Биомолекулы выделяли из тканей тимуса, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов свиней экстракцией в условиях пониженного содержания дейтерия в экстрагенте (D/H = 40 ppm, 0,9% NaCl, гидромодуль 1:5, T = 4°C, 400 об/мин); с последующей ультрафильтрацией (P = 2,5, разделение до 30 кДа). Эксперимент проводили на крысах-самцах, массой 400±20 г (Wistar, ЦГР ИЦиГ СО РАН), с моделью иммунодефицита («Циклофосфамид») (Sigma) 100 мг/кг веса внутрибрюшинно, трехкратно, каждые 72 ч.), произвольно распределенных на: положительный контроль (1 группа); опыт (2 группа); отрицательный контроль (3 группа). Опытным крысам *per os* вводили исследуемые биомолекулы из расчета 20±0,2 г/л белка в течение 24 сут. Динамику восстановления крыс оценивали цитофлуориметрическими (GuavaeasyCyte) и иммуноферментными (Immunochem 2100) методами. Терапевтическое воздействие на опытных крыс привело к стимуляции лейкоцитопоза путем усиления секреции IL-6 (до 10%), что выразилось в восстановлении экспрессии клеток Т-системы (увеличение содержания CD3 до 20%, CD4 до 40%), и активации предшественников Т-хелперов, что косвенно подтверждается увеличением содержания IL-2 (до 10%). Отмечена активация каскада комплементарных реакций по классическому пути (увеличение содержания C1q до 10%, C4 до 13% при уменьшении содержания C5 до 6%) в результате повышения концентрации антител (IgG на 16%, IgM на 24%), что опосредованно указывает на репаративное влияние биомолекул на продукцию плазматических В-клеток. Установлено, что тканеспецифичные биомолекулы с молекулярной массой до 30 кДа способствуют репаративной регенерации иммунных компонентов крови после цитотоксического угнетения кроветворения, заключающейся в стимуляции продукции цитокинов

тимическими иммунными клетками и антител клетками В-системы: значительно увеличивают количество зрелых дифференцированных клеток и активируют каскад реакций комплементарного характера.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-16-00008).*

**Васильев А.В.<sup>1</sup>, Фатхудинова Н.Л.<sup>1</sup>, Осидак Е.О.<sup>2</sup>, Бухарова Т.Б.<sup>3</sup>, Домогатский С.П.<sup>2</sup>, Гольдштейн Д.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России

<sup>2</sup> ООО «ИМТЕК»

<sup>3</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»  
vav-stom@yandex.ru

**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОСОВМЕСТИМОСТИ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО КОЛЛАГЕНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ПЕРСПЕКТИВОЙ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ КОСТНО-ПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Биосовместимые полимеры используются в качестве материалов для замещения костных дефектов и стимуляции репаративного неосоостеогенеза. По сравнению с аналогами препараты нативного коллагена, полученные по технологии ООО фирмы «Имтек» (Москва) (экстракция в форме раствора, очистка от белковых примесей, защита от химической модификации) демонстрируют полное отсутствие немедленных или отсроченных реакций отторжения при имплантации образцов в различные органы животных. Механические свойства плотных гидрогелей производства «Имтек», в том числе коллагеновых гелей, наполненных гидроксилалатитом, близки к свойствам используемых в стоматологической практике коммерческих костно-пластических материалов. Перспективность применения таких препаратов в сочетании с приемами клеточной инженерии дает основу создания новых подходов при выполнении костно-пластических операций.

**ЦЕЛЬ.** Оценить цитотоксичность и цитосовместимость препарата Колладентс (Имтек, Москва) в отношении мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) различного происхождения.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Гидрогель на основе коллагена Колладентс был помещён в питательную среду DMEM (ПанЭко, Россия) на 3 сут. в соотношении 1:1. Полученный экстракт питательной среды ежедневно добавляли к культурам ММСК, выделенных из жировой ткани и пульпы молочных зубов (SHED-клеток) трёх различных доноров. Через 1, 4, 7 сут. выполняли МТТ-тест по общепринятой методике. В качестве контроля использовали водные экстракты из материалов «Индост-Гель», «Индост (гранулы)» (Полистом, Россия) и «Bio-Oss» (Geistlich, Швейцария), «Биопласт» (ВладМива, Россия) и чистую питательную среду. Для определения клеточной адгезии клетки сажали на поверхность материалов и окрашивали витальным красителем РКН-26. Далее на 1, 7 и 14 сут. получали изображения клеток на поверхности материала с помощью флуоресцентной микроскопии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Водные экстракты исследуемых материалов не оказывали статистически значимого

цитотоксического воздействия на культуры ММСК, выделенные из жировой ткани. Однако для культур SHED-клеток на 1-е и 3-е сут. эксперимента было показано цитотоксическое воздействие материалов «Индост (гранулы)» и «Bio-Oss», к 4-м и 7-м сут. эксперимента слабое (не ниже 80% относительной выживаемости клеток). На всех сроках наблюдения исследуемый материал «Колладентс» и «Индост-Гель» не показывали статистически значимого цитотоксического воздействия на относительную выживаемость клеток. Все исследуемые материалы способствовали клеточной адгезии.

Финансирование исследования: *Бюджет.*

**Васильев А.В.<sup>1</sup>, Кузнецова В.С.<sup>1</sup>,  
Загоскин Ю.Д.<sup>2</sup>, Бухарова Т.Б.<sup>3</sup>,  
Григорьев Т.Е.<sup>2</sup>, Чвалун С.Н.<sup>2</sup>,  
Гольдштейн Д.В.<sup>3</sup>, Кулаков А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

<sup>3</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»  
vav-stom@yandex.ru

#### **СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИМПРЕГНИРОВАННОГО БЕЛКА ИЗ ПОЛИЛАКТИДНЫХ И ХИТОЗАНОВЫХ ГРАНУЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ РАЗМЕРА В СОСТАВЕ ТЕРМОТРОПНОГО ОТВЕРЖДАЕМОГО ХИТОЗАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Для нужд стоматологии, травматологии и ортопедии активно разрабатываются активированные костно-пластические материалы. Они представляют собой матрицу-носитель, выполняющую роль наполнителя объема с импрегнированным фактором роста. Возможность задавать пик кинетики высвобождения лекарственного препарата из таких материалов является важной задачей современной фармакологии и биоинженерии, т.к. неконтролируемое высвобождение факторов роста в первые часы после имплантации материала не обеспечивает эффективную дифференцировку клеток: большая часть факторов роста будет потрачена впустую, заставляя существенно увеличивать концентрацию дорогостоящего остеоиндуктора. Комбинация хитозанового гидрогеля с гранулами хитозана и полилактида является перспективной основой для проектирования активированных костно-пластических материалов.

**ЦЕЛЬ.** Определить зависимость кинетики высвобождения белков от размера полилактидных и хитозановых частиц, включенных в термоотверждаемый хитозановый гидрогель.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Пористые частицы хитозана и полилактида получали с применением сублимационной сушки замороженных эмульсий полимера, полученных распылением. Импрегнацию белка проводили как после получения частиц в случае полилактида, так и *in situ* при получении частиц хитозана. Для получения наполненных гидрогелей частицы постепенно добавляли к раствору хитозана с  $\beta$ -глицерофосфатом при температуре 4°C. Для отверждения гидрогеля раствор нагревали до 37°C и выдерживали 40 мин. Оценку кинетики высвобождения модельного белка (BSA) в десятикратную по объему среду, представленную физраствором, проводили колориметрически. Результаты. Пик кинети-

ки высвобождения BSA из частиц с хитозаном был отмечен на 2-е сут., в то время как полилактидные гранулы показывали пик высвобождения BSA к 3-м суткам и 6-м сут.. Так, крупные хитозановые частицы к 2-м сут. высвобождали 84+5% от всего импрегнированного белка, а мелкие — 68+7%. Статистически значимая разница в кинетике высвобождения BSA между крупными и мелкими частицами из полилактидных гранул не была выявлена. К 3-м сут. из крупных гранул в окружающую среду выделилось 45+12% от всего количества импрегнированного BSA, а из мелких — 49+8%.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект No 16-15-00298).*

**Васильев В.С.<sup>1</sup>, Еремин И.И.<sup>2</sup>, Васильев С.А.<sup>1</sup>,  
Важенин А.В.<sup>3</sup>, Терюшкова Ж.И.<sup>4</sup>,  
Васильев Ю.С.<sup>1</sup>, Васильев И.С.<sup>1</sup>, Карпов И.А.<sup>1</sup>,  
Семенова А.Б.<sup>3</sup>, Димов Г.П.<sup>1</sup>, Димова Е.В.<sup>5</sup>,  
Батурина И.Л.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup> ООО «Селлтера Фарм»

<sup>3</sup> Челябинский областной клинический центр

онкологии и ядерной медицины

<sup>4</sup> МБУЗ ГКБ № 8

<sup>5</sup> ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн»  
b\_b\_c\_@mail.ru

#### **МЕХАНИЗМЫ ПРИЖИВЛЕНИЯ ЖИРОВОГО ТРАНСПЛАНТАТА И ВОЗМОЖНОСТИ ЛИПОГРАФТИНГА В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ РАЗЛИЧНЫХ АНАТОМИЧЕСКИХ ЗОН**

**ВВЕДЕНИЕ.** Липографтинг является эффективным инструментом реконструктивной хирургии, позволяющим устранять контурные дефекты различных локализаций с минимальным повреждением донорской зоны. Этапное инъекционное введение жирового трансплантата позволяет воссоздавать значительные объемы жизнеспособных тканей, что дает возможность использовать данный метод как альтернативу стандартным методам реконструкции (лоскутная пластика, применение искусственных имплантатов). Помимо возможности формирования объема инъекции аутологичного жирового трансплантата оказывают регенераторный эффект на патологически измененные ткани при рубцовых и постлучевых повреждениях, что значительно расширяет возможный спектр применения липографтинга.

**МЕТОДЫ.** С 2010 г. липографтинг с целью устранения контурных дефектов был применен у 178 пациентов. Распределение пациентов по локализации было следующим: 77 (43,3%) — область молочной железы, 63 (35,4%) — область головы и шеи, 38 (21,3%) — туловище и конечности. В зависимости от требуемого объема и степени повреждения реципиентной зоны требовалось от одного до 9 этапов липографтинга. Общее количество проведенных операций составило 412. Забор жировой ткани осуществлялся путем вакуумной липосакции канюлями диаметром 2,5 мм. С целью подготовки липоаспирата применялось центрифугирование в двух режимах: 50 g x 2 минуты и 1200 g x 3 минуты. Для введения очищенной жировой ткани использовались канюли

d = 1,0–1,6 мм разной конфигурации (Колман тип 1, 3). При наличии выраженных рубцовых изменений использовалось чрескожное ремоделирование рубцовой ткани или «риггтотомия», выполняемое острыми иглами 16-21G. Для оценки результатов применялись клинические методы исследования, опросники, фотографирование, ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография, гистологическое исследование.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Во всех случаях удалось достичь желаемого результата. Наличие выраженного повреждения тканей реципиентной зоны существенно затрудняло процесс воссоздания объема жизнеспособных тканей. Максимальное количество этапов (6–8) требовалось при наличии поздних лучевых повреждений. При наличии рубцовых повреждений и/или лучевого фиброза отмечено существенное улучшение качества патологически измененных тканей вплоть до их полного восстановления. Наиболее частым осложнением в послеоперационном периоде явилось формирование липогранулем у 11 пациентов (6,2%), которые потребовали устранения путем пункции. У троих пациентов (1,7%) наблюдались серомы и в одном случае (0,6%) отмечено инфицирование в области введения жирового трансплантата. В двух случаях отмечено прогрессирование онкологического процесса в процессе реконструкции.

**ВЫВОДЫ.** Липографтинг является эффективным методом устранения контурных дефектов различных локализаций вне зависимости от степени повреждения тканей реципиентной зоны с минимальным риском развития хирургических осложнений.

**Тодосенко Н.М.<sup>1</sup>, Злацкая А.В.<sup>2,3,4</sup>,  
Литвинова Л.С.<sup>1</sup>, Родниченко А.Е.<sup>2,3,4</sup>,  
Губарь О.С.<sup>2,3,4</sup>, Шуплецова В.В.<sup>1</sup>,  
Гордиенко И.М.<sup>3,4,5</sup>, Зубов Д.А.<sup>2,3,4</sup>,  
Васильев Р.Г.<sup>2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта

<sup>2</sup> ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»

<sup>3</sup> Биотехнологическая лаборатория *ilaya*. *regeneration*,

<sup>4</sup> Медицинская компания *ilaya*

<sup>5</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

rvasyliiev.ilaya@gmail.com

**МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ: ИЗОЛЯЦИЯ, ЭКСПАНСИЯ IN VITRO И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА**

Эндометрий обладает значительной способностью к регенерации, которая базируется на существовании нескольких типов стволовых/прогениторных клеток: эпителиальных, эндотелиальных и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (эММСК). эММСК являются перспективным клеточным типом для использования в регенеративной медицине.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Получить из минимальной биопсии культуру эММСК, размножить до клинически значимого количества и исследовать их морфофункциональные свойства.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Все процедуры были выполнены с добровольного письменного информиро-

ванного согласия пациентов. Образцы эндометрия (n = 10) были получены при помощи биопсии в ходе диагностической гистероскопии в первую фазу менструального цикла. Фрагменты ткани были диссоциированы при помощи ферментативной обработки раствором с 0,05% коллагеназы IA и 0,05% проназы в течение 1 ч. при 37<sup>0</sup>. Клетки были культивированы в ростовой среде следующего состава: базальная среда DMEM:F12, 10% ЭТС, 1 нг/мл FGF-2, 2 мМ стабильного глутамин, 1% раствора антибиотиков/антимикотика в мультигазовом инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Для определения фенотипа, клоногенного потенциала (КОЕф тест), способности к направленной адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференциации, продукции факторов роста/цитокинов при помощи мультиплексного анализа BioPlexPro (Bio-Rad) использовали клетки 3-го пассажа (П).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В первичной культуре популяция эндометриальных клеток была морфологически гетерогенной и состояла из клеток с фибробластоидной и эпителиоидной морфологией. На 3-м пассаже при экспансии по нашему протоколу культура клеток состояла преимущественно из клеток с фибробласто-подобной морфологией. Клетки обладали характерным для ММСК фенотипом: CD73+CD90+CD105+CD34-CD45-HLA-DR-. Также была детектирована позитивная экспрессия следующих маркеров: CD146+CD166+CD49f+CD140a+CD140b+Nestin+. Среднее время удвоения клеточной популяции при экспансии до ПЗ составляло 29,6±1,3 ч. эММСК были способны к направленной адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференциации. Средняя частота КОЕф в культуре ПЗ равнялась 35,7±3,4%. эММСК показывали способность к спонтанному формированию 3D сфероидов. Стабильность кариотипа эММСК при долговременном культивировании (до П8) была подтверждена GTG-окраской. После 48 ч. инкубации в бессывороточных условиях эММСК секретировали следующие факторы роста и цитокины: IL-1ra (74,6±9,5 пг/мл), IL-6 (29,8±8,3 пг/мл), (138,5±33,3 пг/мл), IFN $\gamma$  (55,9±3,8 пг/мл), VEGF (92,2±19,8 пг/мл), GM-CSF (133,2±5,1 пг/мл), FGF-2 (17,8±4,3 пг/мл), хемокины IP-10 (39,9±3,3 пг/мл) и MCP-1 (41,1±6,7 пг/мл). Таким образом эММСК могут быть эффективно размножены из минимальной биопсии с сохранением высокого клоногенного и пролиферативного потенциала, нормального кариотипа и специфического фенотипа. По морфофункциональным свойствам эММСК удовлетворяют минимальным критериям ISCT для ММСК и перспективны для разработки клеточной терапии репродуктивной дисфункции эндометрия.

Финансирование исследования: *Фонд Содействия Инновациям, Грант № 0025429, Договор № 10963ГУ/2016 от 10.02.2017 (код 0025429), конкурс УМНИК 16-10, Финал программы «УМНИК» – Калининградская область.*

**Васильев Р.Г.<sup>1,2,3</sup>, Грицык В.Ф.<sup>3</sup>,  
Литвинова Л.С.<sup>4</sup>, Родниченко А.Е.<sup>1,2,3</sup>,  
Губарь О.С.<sup>1,2,3</sup>, Шуплецова В.В.<sup>4</sup>,  
Злацкая А.В.<sup>1,2,3</sup>, Гордиенко И.М.<sup>2,3,6</sup>,  
Зубов Д.А.<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> Институт генетической и регенеративной  
медицины НАМНУ

<sup>2</sup> Биотехнологическая лаборатория *ilaya*.  
*regeneration*

<sup>3</sup> Медицинская компания *ilaya*

<sup>4</sup> Балтийский федеральный университет  
им. И. Канта

<sup>5</sup> Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины

<sup>6</sup> Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины

rvasyliev.ilaya@gmail.com

### **ПОСТНАТАЛЬНЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ/ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ – ПРОИЗВОДНЫЕ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ: ТРАНСЛЯЦИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ**

Ряд тканей и органов взрослого человека содержит постнатальные мультипотентные стволовые клетки – производные нервного гребня (МСК-ПНГ). Разработка методов их клинического применения является перспективным направлением в регенеративной медицине.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Основываясь на позитивных результатах доклинических экспериментов на животных, провести пилотные клинические исследования для оценки безопасности и эффективности использования МСК-ПНГ из волосяных фолликулов (ВФ) или дермы кожи человека для лечения контузионных повреждений спинного мозга (КПСМ), дефектов костей черепа (КЧ) и грыж межпозвоночных дисков (ГМПД).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Все процедуры были выполнены с письменного информированного согласия пациентов и в соответствии с текущим законодательством Украины. МСК-ПНГ были получены из ВФ методом эксплантов, или выделены из дермы кожи и размножены по нашей оригинальной методике. Культивированные МСК-ПНГ были охарактеризованы при помощи ОТ-кПЦР, иммуноцитохимии, проточной цитометрии, цитогенетического анализа и функциональных тестов. Продукция цитокинов и факторов роста была определена при помощи мультиплексного анализа Bio-PlexPro (Bio-Rad). До включения в исследование все пациенты получали нейрореабилитацию, терапевтическое и/или хирургическое лечение по стандартным протоколам, которые оказались неэффективными, либо пациенты имели противопоказания к хирургии. Три пациента с КПСМ получали комбинированные паравертебральные и интратекальные инъекции аутологичных МСК-ПНГ (доза – 20 млн клеток на инъекцию). Десять пациентов с грыжами межпозвоночных дисков получали паравертебральные инъекции МСК-ПНГ в дозе 10 млн клеток на ГМПД. У трех пациентов критические дефекты костей черепа были восстановлены ткане-инженерным костным эквивалентом на основе МСК-ПНГ. Минимальный период наблюдения составляет один год. Результаты. МСК-ПНГ были успешно получены и размножены от всех пациентов. После экспансии МСК-ПНГ сохраняли нормальный кариотип и имели следующий фенотип: Sox2+Sox10+Nestin+CD73+CD90+CD105+CD140a+CD140b

+CD146+CD166+CD271+CD349+CD34-CD45-CD56-HLA-DR-. МСК-ПНГ демонстрируют *in vitro* следующие свойства: клоногенность, самообновление и способность к мультилинейной дифференциации. МСК-ПНГ продуцируют следующие факторы роста и цитокины: NGF, BDNF, GDNFNT-3, NT-4/5, IL-1ra, IL-10, bFGF, VEGF и GM-CSF. Два пациента с КПСМ поясничного отдела показали улучшение состояния с ASIAC до ASIAD после клеточной терапии. Пациент с КПСМ грудного отдела – улучшение с ASIAB до ASIAC. У пациентов с ГМПД в результате клеточной терапии исчез болевой синдром и МРТ-признаки миелопатии. Также произошло значительное уменьшение размеров протрузий/экструзий МПД. У трех пациентов успешно восстановлены дефекты КЧ с использованием ткане-инженерного костного эквивалента на основе МСК-ПНГ.

**ВЫВОДЫ.** Пилотные результаты клинического применения МСК-ПНГ показали безопасность и эффективность их применения для лечения КПСМ, грыж МПД и дефектов костей черепа.

### **Васильева С.А., Савченкова И.П.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии» им. Я.П. Коваленко  
s.vasileva89@yandex.ru

### **РОЛЬ КЛЕТОК СЕРТОЛИ В КУЛЬТИВИРОВАНИИ СПЕРМАТОГОНИЙ ХРЯКА В МЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В последнее время появляются сообщения о новом подходе для возможного получения спермиев – трехмерном культивировании, наиболее близко имитирующем микроокружение семенного эпителия. Создание данной системы позволит расширить понимание о взаимодействии между клетками Сертоли и ранними мужскими половыми клетками, между половыми клетками и внеклеточным матриксом, а также позволит определить влияние этих взаимодействий на процесс сперматогенеза.

**ЦЕЛЬ.** Оценить влияние клеток Сертоли на сперматогонию хряка при культивировании их в метилцеллюлозе.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В качестве объекта использовали сперматогонии, выделенные из тестикул неполовозрелых помесных 40-сут. хряков. Очистку сперматогоний от других клеточных типов проводили, используя центрифугирование в ступенчатом градиенте перколла с последующим разделением по адгезии. Трехмерный матрикс представлял собой структуру, состоящую из верхнего (мягкого) и нижнего (твердого) слоев, представленных 2,5% и 5% растворами метилцеллюлозы соответственно. Культивирование осуществлялось по схеме «простой сэндвич». Были сформированы две экспериментальные группы. В первой группе верхний слой матрикса был представлен сперматогониями, во второй – смесью сперматогоний и клеток Сертоли. Морфологическую оценку проводили как в нативных препаратах, так и в окрашенных по Гимза мазках. Уровень пролиферации определяли по проросту клеток, а жизнеспособность по окраске 0,1% раствором трипановой сини.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В результате анализа полученных данных установлено, что сперматогонии хряка в обеих экспериментальных группах оставались жизнеспособными вплоть до 21 сут. Гистологический анализ показал равномерное

распределение клеток по верхнему слою матрицы в обеих группах. Морфологический анализ мазков выявил дифференцировку сперматогоний во 2-й группе. На 7 сут. сокультивирования сперматогоний и клеток Сертоли в метилцеллюлозе происходило объединение клеток в группы, формирование цепочек и тяжей, а на 21 сут. формирование структур, подобных семенным канальцам *in vivo*. Клеточный состав образованных на 21 сут. семенных канальцев характеризовался гетерогенностью и был представлен сперматогониями (5%), сперматоцитами 1-го и 2-го порядка (17%), округлыми сперматидами (33%), удлинёнными сперматидами (6%) и клетками Сертоли (39%). Клеточная популяция первой экспериментальной группы характеризовалась гомогенностью и отсутствием дифференцировки на 21 сут. трехмерного культивирования. Оценка пролиферации выявила увеличение численности сперматогоний в первой группе в 2,5 раза. Таким образом, совместное культивирование сперматогоний хряка и клеток Сертоли в 2,5% растворе метилцеллюлозы, способствует дифференцировке сперматогоний до стадии удлинённых сперматид на 21 сут и формированию семенных канальцев *in vitro*.

Финансирование исследования: Средства государственного бюджета.

**Васина Е.В., Костюнина В.С., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Петёвка Н.В.**

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Республика Беларусь  
vasina@blood.by

**МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА ПОДДЕРЖИВАЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ CD34+ КЛЕТК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ**

Разработка технологии получения *ex vivo* клеток гранулоцитарно-моноцитарного ряда из стволовых клеток пуповинной крови может быть востребована в трансфузиологии, где заготовка, хранение и использование зрелых донорских гранулоцитов имеет ряд ограничений. Для поддержания жизнеспособности созревающих в культуре стволовых (CD34+) клеток и стимуляции пролиферации и дифференцировки можно использовать сокультивирование с поддерживающими мезенхимными стромальными клетками (МСК) различного тканевого происхождения. Перспективным источником МСК являются ткани пуповинно-плацентарного комплекса, вследствие безопасности их получения для донора и меньшего риска вирусной контаминации.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Сравнить способность МСК пуповинно-плацентарного происхождения и МСК костного мозга (КМ) поддерживать гранулоцитарно-моноцитарную дифференцировку CD34+ клеток пуповинной крови при сокультивировании *in vitro*. МСК КМ, пуповины либо плаценты получали стандартными методами из материала доноров с их информированного согласия. Плодовую принадлежность МСК плаценты подтверждали методом нестед-ПЦР гена амелогенина. В культуральной среде монослоя МСК определяли уровень секреции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего

фактора (ГМ-КСФ) методом иммуноферментного анализа. CD34+ клетки пуповинной крови культивировали в питательной среде IMDM с добавлением 2% сыворотки крови человека группы АВ (IV), Г-КСФ, фактора стволовых клеток, интерлейкина 3 на монослое МСК КМ, пуповины или плаценты. Дифференцировку гемопоэтических клеток в гранулоцитарно-моноцитарном направлении подтверждали методом проточной цитометрии по наличию маркеров CD13, CD15, CD45. Каждое исследование проводилось в 3–4 повторностях. МСК плаценты характеризовались наиболее высоким уровнем секреции Г-КСФ ( $0,42 \pm 0,07$  нг/мл против –  $0,23 \pm 0,03$  нг/мл для МСК пуповины). Монослой МСК КМ секретировал Г-КСФ ниже предела чувствительности тест-системы (менее 20 пг/мл). ГМ-КСФ секретировался на уровне  $5,0 \pm 2,5$  пг/мл 1,7  $\pm$  0,4 пг/мл и 1,1  $\pm$  0,2 пг/мл МСК плаценты, МСК пуповины и МСК КМ соответственно. Повышенная секреция данных факторов позволяет предполагать больший потенциал МСК плаценты в поддержании предшественников гранулоцитарного роста. В результате 7-дневного сокультивирования доля клеток с фенотипом CD13+CD15+CD45+ составила 36,5  $\pm$  0,5% при использовании МСК плаценты, 33  $\pm$  3% в варианте с МСК КМ и 23  $\pm$  4% с МСК пуповины. Наибольший прирост общего числа гемопоэтических клеток также достигнут на подложке МСК плаценты (106  $\pm$  20 раз), тогда как в присутствии МСК КМ – 63,7  $\pm$  0,8 раз и МСК пуповины – 20,5  $\pm$  3,5 раз. В результате прирост целевых CD13+CD15+CD45+ клеток составил 38,8  $\pm$  8 раз, 21  $\pm$  1,6 раз и 4,6  $\pm$  0,1 раз для вариантов с МСК плаценты, МСК КМ и МСК пуповины соответственно. МСК плаценты способствуют наибольшему приросту предшественников гранулоцитарно-моноцитарного роста дифференцировки с фенотипом CD13+CD15+CD45+, в сравнении с МСК КМ и пуповины в аналогичных условиях.

Финансирование исследования: Государственная программа научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний».

**Вахрушев И.В.<sup>1</sup>, Раева О.С.<sup>1</sup>, Суббот А.М.<sup>2</sup>, Новиков И.А.<sup>2</sup>, Антонов Е.Н.<sup>3</sup>, Попов В.К.<sup>3</sup>, Комлев В.С.<sup>4</sup>, Наместникова Д.Д.<sup>5</sup>, Губский И.Л.<sup>5</sup>, Сухинич К.К.<sup>6</sup>, Ярыгин К.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

<sup>3</sup> Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН

<sup>4</sup> ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

<sup>5</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

<sup>6</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

vakhrunya@gmail.com

**ПУЛЬПА МОЛОЧНОГО ЗУБА КАК ИСТОЧНИК МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) пульпы молочного зуба представляют собой перспективный материал для применения в регенера-

тивной медицине, поскольку способы их получения не включают инвазивных процедур забора материала, а также не обременены этическими ограничениями. Настоящая работа посвящена характеристике свойств первичных культур МСК пульпы молочного зуба, разработке технологий создания на их основе различных тканеинженерных конструкций, а также применению клеток данного типа в качестве экспериментальной модели для изучения процессов хоуминга и миграции мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации. Источником клеточных культур послужили молочные зубы, полученные в результате естественного выпадения. Выделение клеток осуществляли путем ферментативной обработки фрагментов пульпы. Анализ уровня экспрессии поверхностных маркеров, проведенный методом проточной цитофлуориметрии, показал, что клетки обладали фенотипом CD29+, CD34-, CD44+, CD45, CD49b+, CD73+, CD90+, HLA-DR-. Далее была продемонстрирована способность клеток к дифференцировке в трех различных направлениях. После культивирования в остеогенной среде в культурах появлялись локусы остошения с отложениями минерализованного матрикса, а также возрастала активность щелочной фосфатазы. В результате хондрогенной дифференцировки в микросферах наблюдалась продукция кислых гликозаминогликанов, характерных для межклеточного вещества хрящевой ткани. Индукция адипогенеза приводила к накоплению в клетках жировых вакуолей. Таким образом было показано, что клетки полученных культур обладают всеми признаками мультипотентных мезенхимальных клеток. На основе полученных культур МСК пульпы молочного зуба в комплексе с разнообразными трехмерными скаффолдами были созданы экспериментальные образцы тканеинженерных конструкций. Исследование жизнеспособности и наблюдение за морфологией клеток в условиях продолжительного трёхмерного культивирования на скаффолдах осуществляли при помощи биохимических тестов, а также с применением конфокальной и сканирующей электронной микроскопии. Результаты позволили сравнить матриксные свойства разрабатываемых клеточных носителей и оценить перспективность их использования в тканевой инженерии. Помимо вышеперечисленного, было проведено исследование поведения МСК пульпы молочного зуба в условиях их трансплантации *in vivo*. Для этого был разработан оригинальный экспериментальный подход, основанный на мечении клеток магнитными флуоресцентными частицами. Он дает возможность отслеживания введенных клеток как прижизненно (методом МРТ), так и на гистологических препаратах (с помощью флуоресцентной микроскопии). Меченые МСК вводили в головной мозг крысам, после чего наблюдали их инкорпорацию в окружающие ткани. На основании полученных результатов можно заключить, что пульпа молочного зуба является эффективным источником МСК как для терапевтического применения, так и для экспериментальных исследований.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-29-07322 ОФИ\_М).*

**Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Мионов А.В., Кривкина Е.О., Глушкова Т.В., Барбараш Л.С.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»*

velikanova\_ea@mail.ru

#### **ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ТКАНИ DE NOVO НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА РАЗЛИЧНОГО ПОЛИМЕРНОГО СОСТАВА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ RGD-ПЕПТИДАМИ**

В настоящее время ведется активная разработка полимерных протезов сосудов малого диаметра. Модификация биологически активными пептидами может повысить биосовместимость и снизить тромбогенность поверхности за счет селективного связывания с эндотелиальными клетками, привлеченными из кровотока.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить влияние модификации RGD-пептидами на морфологию и механические свойства биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра различного полимерного состава, а также особенности формирования на их основе новообразованной ткани после имплантации графтов в сосудистое русло мелких лабораторных животных.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Графты ( $d = 2$  мм) были изготовлены методом электроспиннинга из поликапролактона (PCL) и композиции полигидроксibuтирата/валерата (PHBV) и PCL. Поверхность части графтов модифицировали RGD-пептидами посредством карбодииимидного связывания с последующей детекцией с помощью окраски оранжем II и нингидринового теста. Исследована морфология графтов сканирующей электронной микроскопией и механические свойства с использованием образцов *a. tammaria* в качестве контроля. Графты PHBV/PCL, PHBV/PCL/RGD, PCL, и PCL/RGD имплантировали в брюшную аорту крыс на 1, 3, 6, 9 мес. Эксплантированные образцы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили иммунофлуоресцентную окраску на фактор фон Виллебранда, CD31 и CD34, коллаген I и IV типа. Ядра клеток окрашивали DAPI. Результаты. Обработка оранжем II позволила обнаружить первичные амины на графтах с RGD-пептидами. Нингидриновый тест подтвердил повышение концентрации аминокрупп от немодифицированных к RGD-модифицированным образцам. Немодифицированные графты и графты с RGD обладали однородной высокопористой структурой. Прочность модифицированных графтов была ниже, чем немодифицированных ( $p < 0,05$ ), но при этом приближалась к аналогичным показателям *a. tammaria*. Особенностью тканевой реакции на имплантацию немодифицированных графтов PCL явилось развитие хронического гранулематозного воспаления в стенке графтов. В графтах PHBV/PCL подобной картины не наблюдалось. Модификация поверхности PCL графтов RGD-пептидами в 2 раза снизила частоту развития гранулематозного воспаления в стенке. Модификация RGD-пептидами графтов PHBV/PCL и PCL ускорила заселение графтов эндотелиальными прогениторными клетками (EPC) и их дифференцировку в зрелые на ранних этапах имплантации. Через 6 мес. наблюдения разница

в степени эндотелизации нивелировалась. Через 6 и 9 мес. имплантации проходимость PNBV/PCL/RGD составила 75% относительно 50% проходимости графтов PNBV/PCL. Прходимость графтов PCL/RGD составила 100% относительно 50% проходимости графтов PCL. Во всех имплантированных графтах на внутренней поверхности присутствовал коллаген IV типа, в адвентиции – коллаген I типа.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Модификация RGD-пептидами графтов из PNBV/PCL и PCL способствовала раннему формированию функционально состоятельного эндотелиального слоя и полноценной ткани de novo на основе биодеградируемых трубчатых каркасов.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» за счет двух источников финансирования: 1) в рамках основного научного направления ФГБНУ НИИ КПССЗ «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов» (рег. № АААА-А16-116011910160-5 от 19.01.2016.); 2) за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050).*

**Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В.**

Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
proskurnina@gmail.com

**СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫЕ СТАДИИ  
ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК**

Регенеративные процессы в живых системах динамично связаны с процессами завершения жизни клетки, в частности, программируемой смертью клеток, которая имеет большое значение в процессах развития организма, обновления клеток в организме, репарации после повреждения. Апоптоз в очагах повреждения тканей, например, при инфарктах и инсультах приводит к гибели значительной части не только поврежденных, но и вполне жизнеспособных клеток. В развитии практически всех болезней, связанных с возрастом, включая нейродегенеративные болезни, диабет и другие, большая роль принадлежит апоптозу функционирующих и невозобновляемых клеток, который в данной ситуации нежелателен. С другой стороны, апоптоз является нереализуемым способом борьбы организма с чужеродными, в том числе с раковыми клетками, и наиболее прямым методом борьбы с ними служит апоптоз, который вызывают практически все имеющиеся противораковые средства. Данные последних лет доказывают, что ключевую роль в развитии апоптоза играет комплекс цитохрома с с кардиолипином (Цит-КЛ), обладающий свойствами пероксидазы и липопероксидазы. Основная концепция, бытующая в литературе, заключается в том, что комплекс Цит-КЛ представляет собой связанный с мембраной ЦитС, конформация которого слегка изменена. Последние данные говорят о том, что комплекс является наносферой, где молекула цитохрома с, в состоянии частичного плавления окружена монослоем кардиолипина, толщина которого и содержание липида зависят от pH. Комплекс Цит-КЛ, обладая высокой радикал-об-

разующей способностью в квази-липоксигеназной и липопероксидазной реакциях, вызывал апоптоз и гибель не только обычных раковых клеток, но и клеток, резистентных к наиболее распространенным противораковым препаратам. Свободно-радикальные реакции играют роль не только в развитии апоптоза, но и других видов программируемой гибели клеток. Так, заключительная стадия ферроптоза предполагает экстернализацию фосфатидилсерина, и можно предположить, что липопероксидаза в цитозоле связывается с фосфолипидами в составе мембраны и их окисляет. При эритроптозе предполагается, что липидная пероксидация в мембране эритроцита, катализируемая мембрано-связанным метгемоглобином, является причиной экстернализации фосфатидилсерина. В целом, несомненно, что управление апоптозом, важное для профилактики и лечения многих социально-значимых заболеваний, может быть осуществлено путем активации и подавления радикал-образующих реакций различными про-и антиоксидантными соединениями и физическими воздействиями, включая такие, как лазерное облучение.

**Водякова М.А.<sup>1</sup>, Дроздова М.Г.<sup>1</sup>,  
Маслова М.В.<sup>2</sup>, Касаткина М.А.<sup>2</sup>,  
Демина Т.С.<sup>3</sup>, Успенский С.А.<sup>3</sup>,  
Кильдеева Н.Р.<sup>2</sup>, Марквичева Е.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН

<sup>2</sup> ФГБОУ «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина»

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова»  
marishkalava@mail.ru

**КОМПОЗИЦИОННЫЕ КОВАЛЕНТНО СШИТЫЕ  
ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА  
И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ  
ИНЖЕНЕРИИ**

Создание биодеградируемых полимерных матриц, обеспечивающих адгезию, рост и пролиферацию клеток, является приоритетной задачей тканевой инженерии. В данной работе для получения гидрогелей использовали природные биоразлагаемые полисахариды хитозан (Хит) и гиалуроновую кислоту (ГК). Хит обладает антибактериальной и биоадгезивной активностью, а ГК является основным внеклеточным компонентом соединительной ткани и участвует в процессах роста, пролиферации и дифференцировки. Для получения механически стабильных композиционных Хит-ГК гидрогелей проводили сшивку макромолекул Хит глутаровым альдегидом (ГА) или дженипином (Дж).

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Получение ковалентно сшитых композиционных гидрогелей на основе Хит и ГК, исследование их структуры и свойств, а также способности поддерживать рост животных клеток in vitro. Гидрогели получали на основе Хит (ММ 320 кДа) и ГК (ГК-5 с ММ 5 кДа и ГК-30 с ММ 30 кДа), при этом ГК вводили в матрикс двумя способами: до или после сшивки Хит. При введении ГК до сшивки, растворы Хит и ГК смешивали (Хит/ГК = 5:1 w/w) и сшивали Дж или ГА. При этом ГК распределялась в объеме гидрогеля. Для введения ГК после сшивки, ковалентно сшитый гидрогель Хит инкубировали в растворе ГК (2% w/v), при этом молекулы ГК



адсорбировались по поверхности матрикса. В работе получали две серии гидрогелей, которые различались временем сшивки и наличием стадии промывки. Гидрогели серии 1 сшивали 2 ч. и не промывали, а серии 2 сшивали 24 ч. и затем промывали водой. Структуру матрикса изучали с помощью сканирующей электронной и конфокальной лазерной микроскопии. Культивирование мышинных фибробластов (L929) в матриксах проводили в среде DMEM (10% FBS) в течение 7 дней. Распределение, адгезию, а также рост клеток в матриксах оценивали с помощью конфокальной микроскопии, а количество жизнеспособных клеток определяли методом МТТ-теста. Оптимальными для роста клеток оказались образцы обеих серий с ГК-5, введенной в объем матрикса (до сшивки Хит с помощью Дж) и образцы, сшитые ГА, серии 1.

Финансирование исследования: *Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 15-04-07669 А)*.

**Войтехович А.С., Васина Е.В., Костюнина В.С., Северин И.Н., Петёвка Н.В.**

*РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий*

voytehovichas@gmail.com

#### **ЭРИТРОИДНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

Развитие технологий получения ex vivo зрелых клеток крови из стволовых гемопоэтических клеток (ГК) актуально для развития медицинской трансфузиологии. Моделирование in vitro костномозговой ниши в ходе дифференцировки может восстановить некоторые межклеточные взаимодействия, важные для созревания функциональных клеток. Предполагается, что эндотелиальные клетки (ЭК) пуповинной крови (ПК), как наиболее близкие к ЭК костного мозга, могли бы моделировать in vitro васкулярированную костномозговую нишу, как важную составляющую терминальной стадии дифференцировки ГК.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать способность ЭК ПК поддерживать дифференцировку гемопоэтических клеток в эритроидном направлении in vitro.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Образцы ПК были предоставлены ГУ РНПЦ «Мать и дитя» Минздрава Республики Беларусь после письменного информированного согласия рожениц. ЭК получали культивированием фракции мононуклеаров ПК в селективной среде в присутствии факторов VEGF, FGF, EGF. Фракцию CD34-положительных (CD34+) клеток ПК получали методом положительной иммуномагнитной сепарации с помощью набора EasySep (StemCell) согласно инструкции производителя. Эритроидную дифференцировку ГК ПК проводили по методу GiarratanaM., 2011 с модификациями в двух вариантах культивирования: без и на монослое ЭК ПК (N = 4). Степень дифференцированности клеток анализировали иммунофенотипически по уровню одновременной экспрессии ранних (CD45, CD36, CD71) и поздних (CD235a) кластеров дифференцировки и морфологическими методами.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Полученные культуры ЭК отличались высокой скоростью пролиферации и имели фенотип CD34+CD105+CD31+CD90-CD45-. Уровень экспрессии CD34 снижался при пассирова-

нии клеточной культуры, к 4 пассажу доля CD34+ клеток составила 22%, время удвоения — 14 ч. В функциональном тесте на матрикселателю клетки образовывали ячеистую сосудистоподобную сеть. Чтобы уменьшить влияние секретируемых ЭК цитокинов, направляющих дифференцировку ранних стволовых клеток в гранулоцитарно-моноцитарном направлении, сокультивирование с ЭК использовали с 7-х сут. эритроидной дифференцировки. На 7-е сут., прирост ядросодержащих клеток (ЯСК) составил  $110 \pm 52$  раза. Последующее культивирование в течение 10 сут. без вспомогательных клеток позволило дополнительно нарастить ЯСК еще до 47 раз, при этом доля клеток, экспрессирующих линейный маркер эритроидной дифференцировки CD235a составила  $80 \pm 7\%$ . В присутствии ЭК дополнительный прирост ЯСК составил  $68 \pm 4$  раз с долей CD235a+ клеток  $80 \pm 12\%$ . При этом средняя интенсивность флуоресценции (MFI) по CD235a для варианта культивирования без вспомогательного монослоя составила  $80 \pm 7$ , для варианта с использованием ЭК —  $230 \pm 170$ , что свидетельствует о более высокой экспрессии маркера созревания эритроцитов. В варианте сокультивирования ГК на подслое ЭК отмечалось высокое содержание эритроидных предшественников промежуточной стадии дифференцировки CD36+CD235a+CD45- (нормобласты). В популяции CD235+ клеток 24% теряли CD36, что характерно для поздних стадий ядерных предшественников эритроцитов и безъядерных клеток.

**ВЫВОДЫ.** Использование ЭК в качестве вспомогательного подслоя поддерживает эритроидную дифференцировку гемопоэтических клеток пуповинной крови до терминальных стадий созревания клеток эритроидного ряда. Использование эндотелиальных клеток пуповинной крови в качестве поддерживающего слоя положительно сказывается на общем приросте эритроидных предшественников.

Финансирование исследования: *Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований*.

**Кулаков А.А.<sup>1</sup>, Волков А.В.<sup>2</sup>, Бухарова Т.Б.<sup>3</sup>, Кречина Е.К.<sup>1</sup>, Гольдштейн Д.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» alex.volkoff@gmail.com

#### **РЕГЕНЕРАЦИЯ ПУЛЬПЫ ЗУБА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПУЛЬПЫ ЗУБОВ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Восстановление жизнеспособной ткани пульпы зуба при нарушении целостности пульпарной камеры в отсутствие воспалительных процессов является важной клинической задачей, позволяющей сохранить зуб.

**ЦЕЛЬЮ** настоящей работы является изучение регенерации тканей пульпы при трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пульпы коренных зубов в составе фибринового сгустка в пульпарную камеру после пульпоэктомии у мини-атюрных свиней.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Культуры МСК получали из зубов миниатюрных свиней. Зубы обрабатывали хлоргексидином, извлекали пульпу и дезагрегировали ткани путем инкубации в растворе коллагеназы I типа (2 мг/мл). Клеточную культуру инкубировали в ростовой среде: ДМЕМ, 10% ЭТС, 100 мг/л амикацина при стандартных культуральных условиях. Затем клеточную суспензию суспензировали в обогащенной тромбоцитами плазме крови с последующей полимеризацией в присутствии тромбина и хлористого кальция. Трансплантат помещали на дно пульпарной камеры в область частично резецированной пульпы премоляров и моляров миниатюрных свиней. Животных выводили из эксперимента на 14, 30 и 60 сут. Зубной ряд удаляли путем остеотомии альвеолярного гребня, после чего ленточной пилой индивидуализировали образцы зубов вместе с окружающей костной тканью. Зубы фиксировали и заливали в полиэтилметакрилат, производили из них шлифы толщиной 35–50 мкм, которые окрашивали толуидиновым синим и кислотным фуксином.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Через 14 сут. после трансплантации тканеинженерной конструкции в пульпарной камере выявляется трансплантат, имеющий характерную базофильную клеточную структуру. Устья каналов корней со стороны пульпарной камеры по внутренней поверхности содержат участки с ячеистой структурой, часто богатой сосудами и высокой плотностью клеток, напоминающей грануляционную ткань. К 60-м суткам между сосудами выявляется рыхлый волокнистый матрикс, заполняющий до 2/3 объема. В области дна и боковых стенок пульпарной камеры заметны отложения дентина, а под трансплантатом выявляются дентиновые мостики, признаки образования которых наблюдались уже на 30 сут. Коронка зуба сохраняет целостность своей структуры на протяжении всех сроков наблюдения. В контрольной группе (без трансплантации тканеинженерной конструкции) пульпарная камера содержит обрывки волокнистых структур без клеточных элементов. Коронка зуба к 60 сут. наблюдения имеет трещины и сколы. Корни зуба и шейка зуба с очаговыми признаками остеокластической резорбции, чаще в области межкорневой щели. Таким образом на модели частичной резекции пульпы премоляров и моляров у миниатюрных свиней показано, что трансплантация аутологичных мультипотентных стромальных клеток пульпы зуба в сочетании с аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой приводит к восстановлению пульпы зуба, репаративному дентиногенезу с образованием дентиновых мостиков к 30 сут. наблюдения.

Финансирование исследования: *Грант РФФ № 16-15-00298.*

#### **Волков А.В.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова»  
Минздрава России  
alex.volkoff@gmail.com*

#### **ОСОБЕННОСТИ КОСТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТРАНСПЛАНТАТОВ В ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ**

В настоящее время среди биоматериалов, используемых для трансплантации в челюстно-лицевой хирургии «золотым стандартом» рассматривается трансплантация аутогенной кости. Аутогенная трансплантация костной ткани отличается идеальной совместимостью, прогнозируемой эффективностью, но при этом существует проблема донорских зон. Аллогенная трансплантация кости ограничена различиями в гистосовместимости, риском инфицирования и др. В свою очередь тканевая инженерия костной ткани рассматривается как перспективный метод восстановления костной ткани в челюстно-лицевой хирургии, позволяет использовать как аллогенные, так и аутогенные стромальные клетки соединительной ткани в качестве источника стимуляции репаративного остеогенеза. Однако литературные данные о сравнительной эффективности вышеперечисленных трансплантатов противоречивы. В связи с этим вызывает определенной интерес изучение сравнительной эффективности применения трансплантатов различного генеза в сравнимых условиях: нозология, локализация и сроки наблюдения, показанная с использованием методов гистоморфометрии.

**ЦЕЛЬ.** Проведение сравнительного гистоморфометрического анализа различных методов трансплантации костной ткани и тканеинженерных конструкций (ТИК) при выраженной атрофии кости в области верхней и нижней челюсти.

**МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ** — гистологические препараты костной ткани, полученные в клинических исследованиях. Пациентам были выполнены аутогенной и аллогенной стромальных клеток, преддифференцированных в остеогенном направлении. При расширенном морфометрическом исследовании определяли объемные показатели структурных компонентов костных регенератов, параметры костного баланса, активность остеогенеза и остеоклазии.

В РЕЗУЛЬТАТЕ выявлено, что активность остеогенеза после аутогенной трансплантации кости при различных вариантах обработки костной ткани, а также при различных условиях фиксации аутогенных трансплантатов имеют принципиальные отличия. В свою очередь, при проведении сравнительной морфометрической характеристики костных регенератов после трансплантации ТИК на основе аллогенных и аутогенных клеточных культур, выявлено, что стимуляция репаративного остеогенеза приводит к образованию сравнимых объемов костной ткани, однако костный баланс при аллогенной трансплантации смещен в негативную область. Выявлено, что активность остеогенеза при использовании измельченной кости и аутологичной ТИК оставалось на высоком уровне при достаточном для дентальной имплантации объеме костной ткани к 120 сут., что подтверждается смещением костного баланса в положительную сторону. Таким образом, углубленный сравнительный морфо-

метрический анализ костных регенератов продемонстрировал высокую эффективность в выявлении и идентификации ключевых процессов, протекающих в трансплантатах и окружающей их костной ткани. Среди методов аутотрансплантации кости наибольшую эффективность демонстрируют методы с измельчением костной ткани и обеспечением адекватного их кровоснабжения. Аналогичные результаты имеют место и при аутотрансплантации ТИК. В свою очередь выявлена сравнительная эффективность аутотрансплантации костной стружки и ТИК, что дает основания считать методы трансплантации ТИК и аутотрансплантацию фрагментированной кости сравнимыми по эффективности методами.

**Волова Л.Т., Россинская В.В., Пугачев Е.И.,  
Нефедова И.Ф., Тимченко Е.В.**

*Институт экспериментальной медицины  
и биотехнологий Самарского государственного  
медицинского университета  
csrf.sam@mail.ru*

#### **НОВЫЙ ПРОДУКТ КЛЕТочно-ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДВОЙНОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Создана новая ткане-инженерная конструкция (ТИК), состоящая из 2 компонентов — клеточного и тканевого. Она представлена 3-D пористым биоматриксом с прикрепленными на его поверхности клетками, полученными из гиалиновой хрящевой ткани методом культивирования по Бритбергу в модификации авторов. Основой нового продукта является деминерализованная спонгиоза, изготовленная по оригинальной технологии «Лиопласт®» (патент РФ № 2366173 от 15.05.2008), особенностью которой является преимущественное применение физических факторов. Впервые в мировой практике в производственный процесс включена обработка исходного материала низкочастотным ультразвуком (приоритет подтвержден патентами РФ: патент РФ № 2170016 от 17.02.1999, патент РФ № 2156139 от 15.03.1999, патент РФ № 2166252 от 21.04.1999). Проведена паспортизация носителя с помощью биохимических, физических, морфологических методов исследования. Результаты исследования *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют об отсутствии антигенности и токсичности, высокой биосовместимости и сохранении ряда биологически активных белковых компонентов (TGF- $\beta$ , коллагенов, гликозаминогликанов и других белков межклеточного вещества, участвующих в регенеративном процессе). Хондробласты в экспериментальных и клинических целях получали из гиалинового суставного и реберного хряща человека и лабораторных животных (крыс, кроликов). Идентификация клеток проведена с помощью морфологических, биохимических, иммуногистохимических методов и иммунофенотипирования. Культивировали ТИК в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Данная конструкция использована в доклинических исследованиях при хондропластике на животных с аллогенными носителями с ауто и алло использованы. Исследования *in vivo* свидетельствует о восстановлении гиалиновой хрящевой ткани и структуры субхондральной кости на посттравматических моделях при использовании как аутологичных, так и аллогенных клеток в составе ТИК. Разработанный продукт был применен в качестве биологической модели для изучения воздействия факторов космического полета на жизнеспособ-

ность и регенеративный потенциал клеток опорных тканей. Исследования, проведенные на беспилотных космических аппаратах БИОН-М1 и ФОТОН-М4, показали пригодность данной модели для использования в длительных экспериментах по изучению морфофункционального состояния клеток как на Земле, так и в космосе.

**Воловик М.Г., Докукина Л.Н., Перетягин П.В.**

*ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский  
исследовательский центр» Минздрава России  
afanassy@mail.ru*

#### **АППАРАТУРНЫЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕЖЕЗАГОТОВЛЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ОЖОГОВ У ДЕТЕЙ**

У 29 детей в возрасте от 6 мес. до 12 лет с ожогами II-III степени на площади от 10 до 80% поверхности тела производили оценку состояния микроциркуляции в раневой поверхности и ее перифокальной зоне перед нанесением суспензии с аутологичными клетками (Патент РФ № 2499603, 2013) с помощью динамического инфракрасного (ИК) картирования. Исследования проводили на матричном тепловизоре ThermoTracer TH-9100 (NEC, Япония) по методике, включающей холодовую пробу (патент РФ № 2085109, 1999, модифицировано). Регистрировали исходное распределение температур, после чего проводили холодовую пробу, фиксируя температурные характеристики сразу по окончании действия хладагента и через 3 мин. Повторное тепловизионное обследование проводили при первой перевязке на 5–8 сут. Для объективной оценки состояния микроциркуляции в пределах ожоговой раны использовали лазерный анализатор капиллярного кровотока ЛАКК-М (НПП «Лазма», Россия). Проведен сравнительный анализ исходного состояния микроциркуляции перед посадкой клеток и результирующего распределения температуры и показателя микроциркуляции, зарегистрированных при первой перевязке. По данным ИК картирования ТВ ( $n = 53$  области измерений в пределах ожоговой поверхности) зарегистрировано 22 случая снижения температуры на этапе первой перевязки (разброс от  $-0,2$  до  $-3,9^{\circ}\text{C}$ , в среднем  $-1,6^{\circ}\text{C}$ ) и 31 случай — повышения (разброс от  $+0,2$  до  $+5,8^{\circ}\text{C}$ , в среднем  $2,2^{\circ}\text{C}$ ), то есть отмечена несколько более выраженная, но недостоверная тенденция к повышению. По данным ЛДФ (60 областей измерений: по 20 — интактные участки, пограничная зона и ожоговая поверхность), отмечено отсутствие достоверных отличий значений показателя микроциркуляции в конце исследования по сравнению с исходными в интактных участках (6,76 против 6,49 перф. ед.), достоверное снижение в пограничной зоне (19,84 против 23,50 перф. ед.) и достоверное повышение — на ожоговой поверхности (28,16 против 23,93 перф. ед.). Полученные данные свидетельствуют о перспективности аппаратной оценки состояния микроциркуляции в ожоговой ране. После лечения, по тепловизионным данным, наблюдается выравнивание градиентов по ее поверхности, снижение разницы температур с окружающими тканями, уменьшение мозаичности. Очевидно, что при анализе температурных трендов (интегральное снижение или повышение) следует учитывать возраст, давность и локализацию травмы, обще-

соматическую тяжесть состояния, наличие сопутствующих заболеваний. Мы полагаем, что должны существовать прогностически значимые температурные критерии, свидетельствующие о целесообразности применения клеточных технологий при лечении ожоговых поражений у детей, а сочетание тепловидения и ЛДФ — оптимальный аппаратурный комплекс неинвазивных методов диагностики, прогноза и оценки эффективности лечения по данной технологии.

Финансирование исследования: *Федеральный бюджет.*

#### **Вологжанина Н.В.**

*ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им.К.И. Скрябина»  
garfieldvd@yandex.ru*

#### **МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ РАЗНЫХ ТИПОВ НА МОДЕЛИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ РОГОВИЦЫ**

Лечение животных с заболеваниями и повреждениями роговицы глаза, при которых имеется выраженная несостоятельность процессов регенерации, приводящая в итоге к значительному снижению остроты зрения и слепоте, остается актуальной проблемой ветеринарной офтальмологии. В эксперименте на моделях язвы роговицы у кроликов нами предпринята попытка применить стромальные клетки жировой ткани, лимбальные стволовые клетки и стромально-васкулярную фракцию из жировой ткани (СВФ), путём введения суспензированной взвеси клеток субконъюнктивально, с целью выявления их пролиферативных свойств. Цель исследования. Оценить эффективность и безопасность применения аутологичных и гомологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, стволовых клеток лимба и СВФ ЖТ в условиях моделированной язвы роговицы у кролика. Задачи исследования: В условиях моделированной язвы роговицы у кролика выявить пролиферативные потенциалы клеточных продуктов следующих типов: аллогенных МСК лимба; аутологичных МСК лимба; аллогенных стромальных клеток из жировой ткани; аутологичных стромальных клеток из жировой ткани; стромально-васкулярной фракции жировой ткани. Провести сравнительный анализ индукции заживления поврежденного эпителия роговицы между стволовыми клетками указанных типов и СВФ ЖТ. На основании клинико-морфологических и иммуногистохимических данных, определить тип стволовых клеточных продуктов, оптимальный по регенераторным свойствам, а также оценить безопасность их применения. Животные были разделены на 5 опытных групп, которым соответствовали исследуемые типы клеточных продуктов и 1 контрольную. Результаты исследования: Результаты гистологического исследования позволяют заключить, что скорость и качество заживления дефекта роговицы глаза у опытных животных превосходили таковые у контрольных, что может свидетельствовать о пролиферативных потенциалах стволовых клеток. Показана возможность использования разных типов стволовых клеток в ветеринарной офтальмологии при повреждениях роговицы, что подтверждается ее

клиническим состоянием и морфологическими характеристиками у подопытных животных и у больных животных в условиях клиники. Полученные результаты исследования по применению стволовых клеток в ветеринарной офтальмологии являются базовыми для использования в практической ветеринарной медицине при регенеративной терапии повреждений роговицы глаза.

#### **Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.**

*ФГБУН «Институт цитологии»  
voronirina@list.ru*

#### **ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ И АКТИВНОСТЬ ММП**

Одним из направлений, исследующих функциональные особенности мезенхимных стволовых клеток (МСК) в процессах их дифференцировок, является выяснение роли матриксных металлопротеиназ (ММП), которые влияют на фундаментальные клеточные процессы, участвуют в процессах ремоделирования тканей и развития органов, специфически модулируя сигнальные пути посредством взаимодействия с субстратами разной природы и путем перестройки внеклеточного матрикса (ВКМ). В настоящей работе использовали клеточные линии МСК, выделенных из костного мозга (FetMSC), и зачатка конечности (M-FetMSC) раннего эмбриона человека. Направленную дифференцировку в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях проводили в культуре микромасс и культуре клеточных сфероидов. Наличие и активность ММП определяли методом зимографии для проб кондиционированной среды культивирования. Нами показано наличие активности ММП-9, ММП-2 и ММП-1 в процессе дифференцировки во всех трех направлениях в линиях МСК, выделенных из одного и того же донора. Сравнительный анализ динамики активностей этих ММП в процессе всех дифференцировок показал различия между монослойными культурами (2D) и полученными из них клеточными сфероидами (3D). Установлена корреляция между уровнем адипогенной дифференцировки на 12 сут. и уровнем активности ММП-9 и 2 в обеих линиях при 2D и 3D культивировании. Показана обратная корреляция между уровнем адипогенной дифференцировки и активностью ММП-1 по сравнению с активностью ММП-9 и 2. В процессе адипогенной и остеогенной дифференцировок присутствие активности ММП-2 на всех исследованных сроках в отличие от ММП-9 может свидетельствовать о необходимости взаимодействия ММП-2 с внеклеточным матриксом (ВКМ) в связи с продолжающейся ремодуляцией ВКМ в процессе дифференцировки. При культивировании в индукционной хондрогенной среде культуры микромасс в течение 21 сут. показан активный хондрогенез. Биохимический анализ показал, что активность ММП в среде снижается по мере дифференцировки, полностью исчезая к 21 сут. Так как в этом случае дифференцировочная среда не содержит сыворотки, то все ММП синтезируются только клетками. Скорость снижения активности различна для разных ММП. По-видимому, в клеточных сфероидных (3D) имеет место более активный процесс хондрогенеза, чем в культуре микромасс (2D). Полученные результаты позволяют предположить, что разные

ММП могут как положительно, так и отрицательно влиять на дифференцировку МСК. Межлинейные различия по активности ММП, и различия между 2D и 3D культурами, возможно, связаны как с влиянием различного микроокружения, в котором находились клетки в организме до перевода их в культуру, так и с разным количеством и структурной организацией ВКМ между 2D и 3D клеточными культурами.

**Воронова А.Д.<sup>1</sup>, Степанова О.В.<sup>1</sup>, Чадин А.В.<sup>1</sup>, Валихов М.П.<sup>1</sup>, Решетов И.В.<sup>2</sup>, Чехонин В.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.П. Сербского» Минздрава России

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова УКБ № 1

nastyanastyav@mail.ru

### **КЛЕТКИ ОБНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Травматические повреждения спинного мозга — актуальная проблема современной нейробиологии и нейрохирургии. Патологические процессы, развивающиеся после травм спинного мозга, часто приводят к образованию кист. Лечение посттравматических кист спинного мозга является одной из трудных задач, и существующие на данный момент хирургические и медикаментозные методы оказываются малоэффективными. На сегодняшний день одним из перспективных и развивающихся направлений в разработке методов лечения посттравматических кист спинного мозга является клеточная терапия. Особенный интерес представляют собой обкладочные клетки, содержащиеся в собственной пластинке обонятельной выстилки.

**ЦЕЛЬ.** Разработать протокол получения обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс и оценить эффективность применения этих клеток в терапии экспериментальных кист спинного мозга крыс.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для получения ткани обонятельной выстилки были использованы крысы линии Wistar. Механически отделяли обонятельный эпителий от собственной пластинки. Собственную пластинку измельчали и культивировали в виде эксплантной культуры. Полученные клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением L-глутамин, FBS, ITS, стрептомицина, пенициллина и гентамицина на чашках, покрытых poly-L-lys. Обкладочные клетки были выявлены по коэкспрессии маркеров GFAP (кислого глиального фибриллярного белка) и p75NTR (низкоаффинного рецептора фактора роста нервов). Моделирование посттравматических кист спинного мозга крыс проводили по методике, разработанной в нашей лаборатории. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после операции. Трансплантацию обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс животным проводили в полость кисты в количестве 750 тысяч клеток (n = 7) и 1,5 миллионов клеток (n = 5) в 25 мкл среды DMEM/F12(1:1). Контрольной группе (n = 7) вводили то же количество среды без клеток. В течение 4 недель после трансплантации оценивали восстановление моторной функции, используя 21-балльную шкалу открытого поля (BBB).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Разработан оптимальный протокол получения и культивирования обкладочных клеток из собственной пластинки обонятельной выстилки крыс. Данные клетки были охарактеризованы по коэкспрессии маркеров GFAP и p75NTR. Чистота полученной культуры составила 95–97%. По результатам BBB-теста было показано, что при трансплантации 750 тыс. клеток не наблюдается улучшения двигательной активности задних конечностей по сравнению с контрольной группой, тогда как при трансплантации 1,5 млн клеток наблюдали положительную динамику восстановления двигательной активности в течение всех 4 нед.

**ВЫВОДЫ.** Разработанный оптимальный протокол получения и культивирования обкладочных клеток из обонятельной выстилки крыс и выявленная эффективность использования этих клеток в терапии экспериментальных травм спинного мозга являются предпосылкой создания тканеспецифичного и аутологичного клеточного препарата обкладочных клеток человека для клинического применения.

Финансирование исследования: *Работа была поддержана грантом РФФИ 17-15-01133: Изучение терапевтического эффекта нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток обонятельной выстилки носа при экспериментальной травме спинного мозга.*

**Воротеляк Е.А., Калабушева Е.П., Терских В.В., Чермных Э.С., Роговая О.С., Васильев А.В.**

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

vorotelyak@yandex.ru

### **РЕКОНСТРУКЦИЯ КОЖНОГО ПОКРОВА И ПРИДАТКОВ КОЖИ МЕТОДАМИ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Клеточные технологии и тканевая инженерия становятся исключительно перспективным направлением развития современной регенеративной биологии. Они позволяют реконструировать ткани и органы с восстановлением характерных для них функций, используя живые клетки.

В нашем коллективе в течение многих лет разрабатываются новые методы культивирования клеток и создаются тканевые эквиваленты, пригодные для использования в клинической практике. Для исследований, прежде всего, выбраны такие клетки, которые могут быть реально востребованы в ближайшее время в клинической практике. К числу этих клеток относятся, в том числе, клетки кожи. Была изучена морфогенетическая способность этих клеток в условиях выращивания вне организма, созданы различные живые тканевые эквиваленты, содержащие культивированные клетки и матрикс. Исследован репаративный эффект разработанных тканеинженерных конструкций в модельных системах после трансплантации на пораженные участки ткани.

Важным основанием для применения клеточных технологий является принцип универсальности тканевых и клеточных эквивалентов. Например, использование аллогенного живого эквивалента кожи, который является морфогенетическим и функциональным подобием кожи, позволяет достоверно и эффективно восстанавливать широкий спектр тканевых эпителио-мезенхимных дефектов. Принципы аллогенных трансплантатов и универсальности (пла-

стичности) живого эквивалента кожи с аутологичными клетками являются новыми решениями, расширяющими сферу его применения. Нами изучены клеточные механизмы восстановления тканей трансплантацией аллогенных тканевых эквивалентов. Показано изменение экспрессии ряда регуляторных агентов: факторов роста, интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ, компонентов внеклеточного матрикса, в частности базальной мембраны, под влиянием аллогенных тканевых трансплантатов. Таким образом, действие аллогенных трансплантатов основано на стимуляции репарации.

Используя модель живого эквивалента кожи, мы также изучили клеточные механизмы эпидермального морфогенеза. Созданы системы культивирования, позволяющие получать *in vitro* зачатки волосяных фолликулов. Продемонстрирована активация ключевых сигнальных путей, вовлеченных в фолликулогенез. Разрабатываются способы получения клеток кожи из плюрипотентных клеток человека. Показана способность зачатков, полученных с использованием данных производных, развиваться в полноценный фолликул после трансплантации иммунодефицитным животным. Описанные подходы позволяют приступить к разработке многокомпонентных эквивалентов кожи, наиболее полно соответствующих нативному органу.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственного задания Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН № 0108-2016-0005.*

#### **Галашина Е.А., Ульянов В.Ю.**

*Научно-исследовательский институт  
травматологии, ортопедии и нейрохирургии  
ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского»  
Минздрава России  
koniuchienko1983@mail.ru*

#### **НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ КАК МАРКЕРЫ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ОЧАГОВЫХ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Из литературных данных известно, что высокие концентрации нейрегулина1-beta1 вызывают рост и дифференциацию эпителиальных, нейронных, глиальных и иных типов клеток в посттравматическом периоде. Завершение раннего периода травматической болезни головного мозга совпадает с началом формирования плотного глиального рубца, состоящего из «реактивных» астроцитов, которые осуществляют усиленный синтез глиального фибриллярного кислого протеина, который играет ключевую роль в дифференцировке астроцитов.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Изучить динамику содержания маркеров регенерации нервной ткани в сыворотке крови больных с очаговыми повреждениями головного мозга.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Пациенты основной группы поступили в стационар в течение 1-х сут. с момента получения травмы. Контрольную группу составили 40 условно здоровых лиц. Методом иммуноферментного анализа изучали количественное содержание в сыворотке крови нейрегулина1-beta1 (humanNRG1-beta1) (RayBio, USA), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) (BioVendor, CzechRepublic). В основной группе исследование указанных параметров осуществляли на 1-е, 7-е,

14-е, 21-е и 30-е сут. с момента получения травмы, в контрольной группе — однократно. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ IBMSPSS 20 Statistics. Рассчитывали показатель достоверности *p*. Значения считали статистически достоверными при  $p < 0,001$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Полученные нами данные о содержании нейрегулина1-beta1 в сыворотке крови больных основной группы свидетельствовали о двухфазных изменениях его концентрации. Уровень NRG-1beta1 увеличивался в 6,9 раз на 7-е по сравнению с 1–4-и сут. ( $p_1 < 0,001$ ), а также на 21-е в 1,9 раз по сравнению с предыдущими сутками ( $p_3 < 0,001$ ). Снижение концентрации NRG-1beta1 в 3,8 раз, не достигающее контрольных значений, происходило на 14-е ( $p_3 < 0,001$ ) и в 5,8 раз — на 30 е сут. ( $p_4 < 0,001$ ) по сравнению с предыдущими. Пиковое увеличение NRG1-beta1 на 7-е сутки исследования является одним из саногенетических механизмов, направленных на повышение чувствительности нервной ткани к действию нейрегулина1-beta1. Второй, менее выраженный подъем концентрации NRG1-beta1, отмечаемый на 21-е сут. посттравматического периода, способствует выживанию нейронов в периоды максимальной потери клеточного пула вещества головного мозга в зоне «ишемической полутени». Уровень GFAP в сыворотке крови больных основной группы характеризовался пиковым повышением значений на 14-е сут. ( $p_2 < 0,001$ ) посттравматического периода в 4,1 раза по сравнению с предыдущими сутками. Максимальная концентрация связана с увеличением объема очага первичного повреждения, что инициирует усиленный синтез GFAP астроцитами, способствуя их дальнейшей дифференцировке, росту астроцитарных отростков, что имеет исключительное значение при повреждениях головного мозга.

**ВЫВОДЫ.** 1. Главным саногенетическим эффектом внутриклеточной регенерации нейронов является нейроцитопротекция, обеспечивающая дифференцировку клеток-предшественников в нейроны, регенерацию мотонейронов. 2. Динамика количественных изменений содержания факторов роста нервной ткани характеризовалась двухфазным повышением концентрации NRG-1beta1, более выраженным на 7-е и менее выраженным — на 21-е сут.; монотонным повышением GFAP с пиковым повышением значений на 14-е сут. посттравматического периода.

**Галиева Л.Р.<sup>1</sup>, Шульман И.А.<sup>1,2</sup>, Огурцов С.В.<sup>1,2</sup>,  
Костенников А.А.<sup>1</sup>, Гаранина Е.Е.<sup>1</sup>,  
Ризванов А.А.<sup>1</sup>, Мухамедшина Я.О.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный университет

<sup>2</sup> Республиканская клиническая больница  
Минздрава Республики Татарстан  
Loisa\_@mail.ru

#### **ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ СПИННОГО МОЗГА СВИНЬИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

Последствия травматического повреждения спинного мозга до сих пор остаются неизлечимыми. В настоящее время в клинической медицине не применяют подходы, которые бы эффективно способствовали регенерации нейронов и глиальных клеток. Тем не менее, на сегодняшний день активно разви-

вается направление с использованием стволовых клеток, заключенных в биополимерные матриксы, что позволяет осуществлять направленную дифференцировку заключенных в матрикс клеток, и создавать для них специфическое микроокружение, соответствующее естественному. В данной работе мы исследовали эффективность наложения на область повреждения спинного мозга свиньи (подострый период) аутологичных мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови (МКПК) и заключенных в фибриновый матрикс Tissucol (Baxter). Эксперименты были проведены на вьетнамских вислобрюхих свиньях, половозрелых самках весом 9–12 кг. Животным под наркозом на уровне Th11 спинного мозга после ламинэктомии наносили TCM вертикально падающим металлическим стержнем весом 50 г с высоты 20 см с последующей компрессией тем же грузом в течение 10 мин. Через 6 нед. после нанесения травмы на область повреждения накладывали МКПК (8 млн), заключенные в Tissucol (150 мкл). Животным контрольной группы в аналогичных условиях эксперимента накладывали Tissucol без клеток.

**РЕЗУЛЬТАТЫ** исследования свидетельствуют, что применение МКПК увеличивает площадь сохранной ткани и снижает посттравматическую кавитацию, что говорит о способности данного типа клеток стимулировать посттравматическую регенерацию спинного мозга свиньи.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60101.*

**Абакушина Е.В.<sup>1</sup>, Гельм Ю.В.<sup>1</sup>, Пасова И.А.<sup>1</sup>, Неприна Г.С.<sup>1</sup>, Кудрявцев Д.В.<sup>1</sup>, Каприн А.Д.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России*

<sup>2</sup> *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»*

*Минздрава России*

*julia\_marizina@mail.ru*

#### **РАЗРАБОТКА МЕТОДА КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ КИЛЛЕРАМИ В ОНКОЛОГИИ**

Цитокин-индуцированные клетки киллеры (CIK), полученные из лимфоцитов периферической крови онкологических больных при активации в присутствии цитокинов *in vitro*, обладают рядом модулирующих функций и участвуют в противоопухолевой защите. Целью работы явилась разработка метода клеточной иммунотерапии (КИТ) активированными лимфоцитами больных меланомой. Для получения CIK выделенные МНК культивировали на протяжении 10–14 дней в среде X-vivo 20, содержащей рекомбинантный альбумин человека с добавлением 250 МЕ/мл IL-2 и 50 нг/мл IL-15. Субпопуляционный состав лимфоцитов до и после активации оценивали на проточном цитофлуориметре FACScan. Оценку кинетики роста, пролиферативную и цитотоксическую активность культивируемых клеток оценивали с помощью сканирующей системы микроскопирования IncuCyteZoom (EssenBioScience, США). Иммунотерапию (ИТ) CIK-клетками проводили 28 больным диссеминированной меланомой от 26 до 82 лет II-III стадии заболевания после химиолучевой

терапии. Клеточный продукт и CIK в количестве 30–100 млн вводили внутривожно 1–2 раза в неделю на протяжении 1–3 мес. Оценка результатов лечения проводилась в соответствии с критериями irRC (Immunerelated Response Criteria). Культура CIK характеризуется присутствием 70–80% эффекторных клеток (CTL, NK, NKT) и повышенной пролиферативной и цитотоксической активностью, отличается высоким уровнем экспрессии активирующих рецепторов CD38, CD25, CD69, NKG2D и HLA-DR. Ни у одного пациента не было замечено ухудшения самочувствия, нежелательных явлений и побочных реакций (лихорадки, изъязвлений в месте инъекции, аллергических реакций, желудочно-кишечных расстройств, тошноты, рвоты). Отмечено снижение побочных эффектов химиотерапии (ХТ) и уменьшение миелотоксического действия ХТ препаратов, что выражалось в отсутствии лейкопении и лимфопении у большинства больных (83,4%), которым проводили КИТ как сопроводительную. Через 17 мес. от начала наблюдения живы 24 (85,7%) человека, частичный ответ с уменьшением размеров метастатических образований — у 3 (10,7%) человек, стабилизация процесса — у 20 (71,4%) больных. Полученные результаты превосходят имеющиеся литературные данные зарубежных исследователей по эффективности КИТ активированными лимфоцитами [Parkhurst M.R. et al. 2011; Sakamoto N. et al. 2015; Knorr D. et al. 2014]. Медиана времени от начала КИТ до прогрессирования — 6 мес.. По данным литературы показатель выживаемости для больных меланомой после различных режимов ХТ не превышает 5–11 мес., а при использовании ИТ цитокинами составляет  $8,2 \pm 3$  мес. Время наблюдения за больными после комплексного лечения с момента начала КИТ — более 12 мес., что в два раза превышает данные литературы. КИТ CIK является безопасным методом лечения, позволяет увеличить продолжительность безрецидивного периода, уменьшить количество побочных эффектов ХТ и улучшить результаты комплексного лечения больных меланомой.

**Гилевич И.В.<sup>1</sup>, Сотниченко А.С.<sup>2</sup>, Карал-Оглы Д.Д.<sup>3</sup>, Губарева Е.А.<sup>2</sup>, Куевда Е.В.<sup>2</sup>, Порханов В.А.<sup>1</sup>, Чехонин В.П.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. С.В. Очаповского»*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России*

<sup>3</sup> *ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии»*

<sup>4</sup> *ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»*

*giliv@list.ru*

#### **МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕВОЙ РЕАКЦИИ НА ПОДКОЖНУЮ ИМПЛАНТАЦИЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ТРАХЕИ У ПРИМАТОВ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В настоящее время постинтубационные и посттрахеостомические стенозы трахеи являются одной из ведущих причин развития патологии трахеи. Разработка тканеинженерных конструкций (ТИК) для замещения пораженной трахеи, когда невозможно выполнить стандартные лечебные процедуры, представляет интерес как для клиницистов, так и исследователей. Одним из свойств, которым

должны обладать ТИК, является биологическая совместимость.

**ЦЕЛЬ.** На модели гетеротопической имплантации исследовать биологическую совместимость ТИК трахеи на основе синтетического трубчатого скаффолда и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток приматов (МСК).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование было выполнено на нечеловекообразных приматах вида *Pariohamadryas* ( $n = 3$ ). Для получения ТИК был использован трубчатый каркас из полиэтилентерефталата, засеянный культурой аллогенных МСК примата, культивированный в ротационном биореакторе в условиях  $CO_2$ -инкубатора в течение 72 ч. Послеобразцы ТИК имплантировали подкожно в область спины примата. Через 21 день наблюдения проводили морфологический анализ подготовленных ТИК и эксплантированных образцов ТИК. Полученные срезы после стандартной проводки окрашивали гематоксилином и эозином, флуорофором DAPI, выполняли исследование с антителами к виментину, маннозному рецептору макрофагов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В течение всего периода наблюдения животные оставались активными, физиологические показатели варьировали в пределах нормы, антропометрические данные не изменялись. Гистологический анализ ТИК, подготовленных к имплантации, выявил хаотично расположенные синтетические волокна, к которым были прикреплены моноклеарные клетки. При окрашивании DAPI ядра клеток активно флуоресцировали. После извлечения образцов было отмечено, что структура матрикса нарушена, выглядела сохранный и аморфной. Вокруг имплантированного образца ТИК была сформирована тонкая капсула, представленная рыхлой волокнистой соединительной тканью без признаков нарушения микроциркуляции, определялось асептическое воспаление без демаркационного вала из нейтрофилов, слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация. В образцах окружающей ткани были обнаружены высокофункциональные макрофаги, представленные крупными клетками с интенсивно базофильной цитоплазмой и выраженными вакуолями, экспрессирующие маннозный рецептор. Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину выявила клетки мезенхимального происхождения как в окружающих имплант тканях, так и внутри него. Интересным было обнаружение виментин-позитивных клеток в сосудах капсулы, что характерно для эндотелиальных клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, полученные результаты указывают на биологическую совместимость ТИК трахеи на тканевом уровне, на отсутствие реакций биологического отторжения и токсичности. Следует отметить, что представленные тканевые изменения соотносятся с описанными признаками биосовместимого материала в литературе.

**Гладкова Е.В., Бабушкина И.В.**

*Научно-исследовательский институт  
травматологии, ортопедии и нейрохирургии  
СГМУ им В.И. Разумовского  
gladckowa.katya@yandex.ru*

**ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ  
НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАНЫ КОЖИ**

Неуклонный рост полиантибиотикорезистентных штаммов, обусловленный нерациональным применением антибактериальных препаратов диктует не-

обходимость разработки нового класса препаратов с выраженным антибактериальным и регенерирующим действием, в том числе – предназначенных для местного использования.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Изучить регенерирующее и антибактериальное действие композиции, содержащей наночастицы меди, цинка, серебра и биополимер на условно-асептическую экспериментальную полнослойную рану кожи.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 30 крысам полнослойную условно-асептическую рану формировали под наркозом в межлопаточной области путем иссечения кожного лоскута с подкожной клетчаткой 400 мм<sup>2</sup>. Животным опытной группы на поврежденную поверхность однократно нанесли композицию; у 10 крыс группы сравнения рана заживала самостоятельно. Состояние регенерации поврежденной поверхности оценивали при помощи цитологических, планиметрических, бактериологических и морфометрических методов исследования. Биохимические исследования включали оценку состояния ПОЛ/АОС по содержанию малонового диальдегида (МДА) и церулоплазмина (ЦП) и соединительной ткани по концентрации агреккана в сыворотке крови. Статистическая обработка проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При проведении контрольных наблюдений у 4 животных группы сравнения отмечали инфицирование раны на 4-7 сут., которое сопровождалось отеком, гиперемией области экспериментальной раны. При проведении бактериологических исследований у трех животных определяли *E. Coli* в концентрации  $3 \times 10^3$  КОЕ, у одного – *St. Spp.* В опытной группе не обнаруживали контаминирующего агента на раневой поверхности во все сроки наблюдения. Планиметрические измерения в группе сравнения свидетельствовали об уменьшении площади раневой поверхности на 51% к 14 сут. наблюдения. У животных опытной группы на 7 сут. происходило уменьшение раневой поверхности на 87%, а полное заживление – к 14 суткам наблюдения. Цитологически в группе сравнения количество нейтрофильных лейкоцитов изменялось незначительно с некоторым снижением к 7-м сут. исследования, имелись признаки дегенерации клеточных элементов. Клетки фибробластического ряда появлялись к 10–14-м сут. У животных опытной группы уже на 5 сут. наблюдения доминировали фибробласты. Показатели липопероксидации у животных опытной группы существенно не отличались от нормальных показателей во все сроки наблюдения. В группе сравнения до 10 сут. отмечали значительное ( $p < 0,05$ ) повышение содержания МДА, а также ЦП, что свидетельствовало о признаках несостоятельности системы антиоксидатной защиты в условиях оксидативного стресса. Высокие значения агреккана на 5 и 7 сут. наблюдения говорили об активности репарационных процессов у крыс опытной группы. Гистологически при выведении животных из эксперимента на 21 сут. в опытной группе отмечали восстановление нормальной структуры кожи; в группе сравнения происходило формирование грубого соединительнотканного рубца, полнокровие подлежащих сосудов. Т.о. местное использование композиций с наночастицами меди, серебра и цинка оказывает регенерирующее и антибактериальное действие на раневую поверхность.



**Глебов В.В., Родионова О.М., Аникина Е.В.,  
Питкевич М.Ю., Кулиева Г.А.,  
Михайличенко К.Ю.**

*Российский университет дружбы народов  
vg44@mail.ru*

**МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ПОВРЕЖДЕНИЯ МЫШЕЧНОГО АППАРАТА  
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ СРЕДОВЫХ  
ФАКТОРОВ**

Скелетные мышцы организма являются объектом воздействия различных средовых факторов (физических нагрузок (ФН), гиподинамии и гипогравитации). Весь комплекс воздействий, осуществляющийся на пределе адаптивных возможностей организма, может оказывать влияние на работу скелетных мышц и приводить к повреждениям. Образовавшиеся повреждения восстанавливаются либо по истечении определенного времени за счет собственных регенеративных потенций мышечной ткани, либо нуждаются в терапевтическом лечении. В основе морфо-биохимических изменений, развивающихся в мышцах при воздействии средовых факторов (ФН, гиподинамии и гипогравитации) имеет разный механизм. Так, повреждения мышечного аппарата при продолжительных ФН сопровождается появлением состояния усталости. При далее продолжающихся ФН отмечается гипоксия, которая ведет к образованию свободных радикалов и повышению лизосомальной активности, а в случае перенапряжения ФН выявляется механический стресс. При высоких ФН отмечаются повреждения скелетных мышц, которые приводят как к локальным, так и к системным нарушениям. На этом фоне отмечаются симптомы усталости, которые сопровождаются выходом мышечных белков в кровотоки (миоглобин, КК, ЛДГ, АсАТ, фосфоглюкоизомераза, тропомиозин, миозин), вследствие повреждения плазмолеммы, развитием воспалительной реакции с участием лейкоцитов, ростом обновления белков в скелетных мышцах. Механизм повреждения скелетных мышц при ФН, включает ряд процессов, таких как: 1) нарушения гомеостаза  $Ca^{2+}$ , сопровождающиеся повышением внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ ; 2) усиление окислительных процессов, в том числе процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ); 3) асептическая воспалительная реакция, протекающая с участием лейкоцитов и активацией циклооксигеназы-2; 4) физический разрыв сарколеммы. В рамках повреждения в процессе ишемии/реперфузии важное значение имеет активность форм кислорода (АФК) — инициаторах ПОЛ и лейкоциты — нейтрофильные гранулоциты. В процессе ФН, протекающей в условиях гипоксии, в мышцах развивается комплекс «повреждающих» метаболических реакций (растет концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , активация  $Ca^{2+}$ -зависимых протеиназ — калпаинов; истощаются запасы макроэргов в мышечном волокне; развивается ацидоз в связи с продукцией большого количества лактата). Таким образом, в целом, общая картина повреждения мышц, которая развивается вследствие сочетанного действия на мышцу механического и метаболического стрессов, можно представить следующим образом. Гипоксия, развивающаяся в мышцах в процессе нагрузки, ведет к накоплению кислых метаболитов и закислению саркоплазмы. Калиемия вызывает сужение кровеносных сосудов, которое усиливает гипоксическую реакцию

в организме. Энергоресурсы мышечной ткани истощаются, что вызывает активацию протеолитических ферментов мышц из-за нарушения транспорта  $Ca^{2+}$ .

**Головнева Е.С.<sup>1</sup>, Ревель-Муроз Ж.А.<sup>2</sup>,  
Онищенко Н.А.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный  
медицинский университет» Минздрава России*

*<sup>2</sup> Многопрофильный центр лазерной медицины  
micron30@mail.ru*

**ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КОСТНОГО  
МОЗГА НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ  
РАНЫ ПЕЧЕНИ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В течение последних лет активно ведется разработка новых методов послеоперационной реабилитации больных с заболеваниями печени. Для восстановления структуры и функций печени достаточно перспективной является активация собственных печеночных клеток, как стволовых, так и дифференцированных гепатоцитов. Источником регуляторных стволовых клеток является костный мозг. Наши предыдущие работы показали усиление миграции CD34+ клеток в кровяное русло под влиянием лазерного воздействия на костный мозг. Однако не изучено влияние данного воздействия на процессы пролиферации гепатоцитов.

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния лазерного облучения костного мозга на пролиферацию гепатоцитов после клиновидной резекции доли печени у крыс.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование проведено на 48 крысах с клиновидной резекцией доли печени (1 см). Животные были разделены на две группы: контроль (без облучения) и опыт (с облучением). Использовали лазер 980 нм, мощностью 0,5 Вт. Зоны локализации костного мозга начинали облучать 1 раз в сутки. Животных выводили из эксперимента на сроках 1, 3, 5, 10 сут. после операции. Препараты печени фиксировались формалином, парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрически производилась оценка ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО), количества двуядерных гепатоцитов на 1 мм<sup>2</sup>. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica 6.0, методом Манна — Уитни.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При сравнительной визуальной оценке зоны резекции печени, в опытной группе, начиная с 5-х сут. эксперимента, отмечался более аккуратный рубец, чем в контроле, отсутствовали спайки между поверхностью печени и окружающими тканями. В группе контроля ядерно-цитоплазматическое отношение плавно увеличивалось с 1 по 10 сут. эксперимента: на 1 сут. ЯЦО составило 0,153(0,131;0,179), на 3 сут. 0,191(0,176;0,215), на 5 сут. 0,266(0,250;0,286), на 10 сут. эксперимента 0,230(0,206;0,250). В группе, где крысы подвергались лазерному воздействию на зоны локализации костного мозга, данный показатель составил: на 1 сут. 0,204(0,177;0,224), на 3 сут. 0,261(0,220;0,281), на 5 сут. 0,282(0,250;0,333), на 10 сут. опыта 0,266(0,235;0,299). Таким образом, в группе лазерного воздействия ЯЦО было выше, чем в группе контроля, достоверные отличия наблюдались на 1, 3 и 10 сут. Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм<sup>2</sup> в группе контроля составило на 1 сут. 33,2(33,2;49,8), на 3 сут. 41,5(33,2;49,8), на 5 сут. 66,4(66,4;83,0) на

10 сут. 66,4(49,8;83,0). В опытной группе данный показатель составил на 1 сут. 49,8(33,2;49,8), на 3 сут. 58,1(49,8;66,4), на 5 сут. 83,0(66,4;83,0), на 10 сут. 74,7(49,8;83,0). Количество двуядерных гепатоцитов на сроках 1 и 3 сут. было достоверно выше в группе опыта.

**ВЫВОДЫ.** В препаратах, полученных от животных с лазерным воздействием на костный мозг, происходило увеличение ЯЦО и количества двуядерных гепатоцитов с первых суток эксперимента. Отличия по ЯЦО наблюдались вплоть до десятих суток. Эти данные свидетельствуют о том, что в опытной группе увеличивалась пролиферация клеток и происходило ускорение регенерации печени. Сведения о влиянии лазерного облучения зон локализации костного мозга на усиление пролиферации гепатоцитов могут быть использованы в разработке инновационных методов лечения заболеваний печени различной этиологии.

**Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Николаев Е.Е., Гунин А.Г.**

*ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»  
golubnata@list.ru*

**ЗНАЧЕНИЕ SR-ПРОТЕИНКИНАЗЫ 1 (SRPK1) ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ДЕРМЫ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ**

Богатые серином и аргинином сплайсинг факторы и протеинкиназы, которые могут фосфорилировать RS-последовательности белков представляют собой мощную регуляторную систему, оказывающую влияние на синтез разнообразных белковых регуляторных молекул.

**ЦЕЛЬ** исследования заключалась в определении взаимосвязей между экспрессией сплайсинг-фактора – SRPK1 с пролиферативной активностью фибробластов и сосудистым обеспечением дермы в возрастном аспекте у человека. Работа проведена на аутопсийном материале кожи плодов, умерших антенатально от 20 до 40 нед. гестации и людей, умерших от различных причин в возрасте от рождения до 85 лет. SRPK1, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), CD 31 выявляли непрямым иммуногистохимическим методом. По результатам исследования в период от рождения до 20 лет содержание SRPK1 возрастает, а с 20 лет начинает планомерно уменьшаться, достигая минимума к периоду 61–85 лет. Содержание SRPK1 в кровеносных микрососудах дермы планомерно возрастает от антенатального периода до периода 61–85 лет. Пролиферативная активность и численность фибробластов дермы, количество кровеносных сосудов в дерме планомерно уменьшается от рождения до 61–85 лет. Возрастное увеличение содержания SRPK1 в фибробластах дермы происходит одновременно с уменьшением их численности и пролиферативной активности. Возрастное увеличение содержания SRPK1 в кровеносных микрососудах дермы происходит одновременно с уменьшением их количества. Следовательно, можно предположить наличие неодинакового участия SRPK1 в процессах роста и обновления разных компонентов дермы в процессе старения. Полученные данные дополняют научную концепцию о механизмах снижения численности и пролиферативной активности фибробластов и кровеносных сосудов дермы в процессе старения.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ 16-44-210018.*

**Гоникова З.З., Никольская А.О., Севастьянов В.И.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов» им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России  
zalina3392@gmail.com*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА АДОПТИВНОГО ПЕРЕНОСА ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ МОРФОРЕГУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ НИХ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ**

Клетки донорского костного мозга (ККМ), несмотря на их высокую морфорегуляторную активность, пока не получили широкого применения в клинике для регуляции восстановительных процессов в поврежденных органах из-за возможности развития опасных осложнений. Целью настоящей работы явилось выделение из ККМ комплекса биологически активных компонентов (КБАК), обладающих сопоставимой с ККМ морфорегуляторной митотической активностью (МА) относительно клеток печени и почек.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar (n = 45). Исследования МА проводили в условиях моделирования адоптивного переноса: МА клеток крыс-реципиентов измеряли после введения ККМ или КБАК крыс-доноров с индуцированной активацией регенерационных процессов. Для этого у крыс-доноров группы 1Д (n = 5) создавали модель острой почечной недостаточности (левосторонняя нефрэктомия), у крыс-доноров группы 2Д (n = 5) – модель острой печеночной недостаточности (50–70% гепатэктомия). Через 12 ч. после моделирования острой печеночной и почечной недостаточности, когда в КМ крыс-доноров выявляли морфогенетически активные клетки, у животных забирали активированные ККМ ( $0,5 \times 10^6$  кл/на крысу) и переносили их внутривенно здоровым животным (реципиентам) для индукции МА клеток почек (группа 1Р, n = 5) и печени (группа 2Р, n = 5). МА эпителия почечных канальцев в группе 1Р оценивали через 12–44 ч., а МА гепатоцитов в группе 2Р – через 12–48 ч. после введения им ККМ от соответствующих крыс-доноров. Активированный КБАК получали также из ККМ животных через 12 ч. после моделирования односторонней нефрэктомии (3Д группа, n = 5) или частичной гепатэктомии (группа 4Д, n = 5). Затем КБАК крыс-доноров вводили внутривенно (15–50 мкг/100 г веса животного) здоровым животным для выявления индукции МА клеток в почках (группа 3Р, n = 5) и печени (группа 4Р, n = 5) в те же сроки, что и в группах 1Р и 2Р. Контролем исходной МА клеток печени и почек служила МА этих клеток у интактных животных после введения им внутривенно физиологического раствора (n = 5). Результаты. Определение МА путем подсчета митотического индекса в почках и печени у крыс-реципиентов в группах 1Р и 3Р и в группах 2Р и 4Р, соответственно, выявило достоверное и сопоставимое повышение МА в клетках печени и почек, по сравнению с контрольными животными. Отмечено сопоставимое повышение МА при увеличении используемой дозы ККМ и КБАК.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** КБАК и ККМ, полученных от доноров с индуцированной активацией регенерационных процессов, сопоставимо воспроизводят увеличение МА клеток печени и почек здоровых реципиентов, и могут быть использованы для индукции регенераторных процессов в поврежденных органах.

Финансирование исследования: *Госзадания Минздрава.*

**Горкун А.А.<sup>1,2</sup>, Зурина И.М.<sup>1,2</sup>, Шпичка А.И.<sup>2</sup>, Королева А.В.<sup>3</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1,4</sup>, Тимашев П.С.<sup>2</sup>, Бутнару Д.В.<sup>2</sup>, Репин В.С.<sup>1,5</sup>, Сабурин И.Н.<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

<sup>3</sup> Ганноверский лазерный центр

<sup>4</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>5</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России  
stgork@gmail.com

#### **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНГИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА СФЕРОИДОВ ММСК ПК И СКЖТ В ФИБРИНОВОМ ГЕЛЕ**

АКТУАЛЬНОЙ ПРОБЛЕМОЙ регенеративной медицины остается быстрое восстановление кровеносной системы при повреждении тканей и органов, а также создание de novo эффективной системы микроциркуляции, обеспечивающей кровоснабжение биоэквивалентов. Одним из перспективных подходов к решению данного вопроса может стать использование трехмерных культур (сфероидов) аутологических клеток в сочетании с биопечатью. В качестве источников аутологических эндотелиальных предшественников и мультипотентных стромальных клеток для получения полноценного капиллярного русла могут быть использованы: Вартонов студень пупочного канатика и подкожная жировая ткань человека.

ЦЕЛЬЮ данного исследования было проведение анализа ангиогенного потенциала индуцированных сфероидов, образованных мультипотентными мезенхимными стромальными клетками пупочного канатика (ММСК ПК) и стромальными клетками жировой ткани (СКЖТ). Сфероиды из ММСК ПК и СКЖТ человека получали в стандартных условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) 3D культивирования в течение 7 сут. на агарозных микропланшетах, приготовленных с помощью форм 3DPetriDishes (Microtissue, USA). Эндотелиальную дифференцировку индуцировали добавлением фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Через 7 сут. часть сфероидов фиксировали для анализа синтеза CD31, Flk-1 и виментина. Часть сфероидов помещали в немодифицированный и модифицированный фибриновые гели, приготовленные с помощью добавления тромбина к фибриногену в соотношении 0,2 U на 1 мг. Модифицировали фибриноген путем добавления к нему O,O'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил]поли(этиленгликоль) в молярном соотношении 5 к 1. Фоторегистрацию осуществляли в приборе для прижизненной цитраферной микроскопии (ChirManTechnologies, Finland). После индукции дифференцировки сфероиды как из ММСК ПК, так и из СКЖТ кроме виментин+ клеток содержа-

ли субпопуляцию CD31+/Flk-1+ клеток. Через 24 ч. после помещения сфероидов ММСК ПК и СКЖТ в гель, наблюдали активную клеточную миграцию в виде тяжей в обоих типах геля. Через 7 сут. CD31+ клетки обеих культур формировали разветвленную сеть тубулоподобных структур, соединяющую отдельные сфероиды. Мезенхимные виментин+ клетки мигрировали разрозненно и прикреплялись к тубулоподобным структурам. В отличие от модифицированного геля, сфероиды ММСК ПК и СКЖТ в течение 3 сут. активно резорбировали немодифицированный фибриновый гель и оседали на поверхность культурального пластика, формируя монослой. При анализе данных, полученных при фоторегистрации, было также установлено, что модифицированный фибриновый гель способствовал образованию большего числа ветвлений в новообразованной сети. Таким образом, было показано, что 3D культивирование ММСК ПК и СКЖТ в индукционной среде обеспечивает эндотелиальную дифференцировку части клеток культуры, подтвержденную синтезом маркеров эндотелиальных клеток (CD31, Flk-1) и способностью к формированию сети тубулоподобных структур in vitro. Клетки сфероидов, в отличие от суспензии клеток, в течение 7 сут. создают упорядоченную сеть, представленную как эндотелиальными, так и мезенхимными компонентами. При этом было выявлено, что модифицированный фибриновый гель является более стабильным субстратом, чем немодифицированный гель, и обеспечивает формирование более разветвленной капиллярноподобной сети. Полученные данные имеют фундаментальное и прикладное значение для разработки технологий получения микроциркуляторного русла с помощью сфероидов из аутологических клеток пациента.

**Горностаева А.Н., Бобылева П.И., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.**

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН  
HindIII@yandex.ru

#### **ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МСК**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются перспективным инструментом для регенеративной медицины благодаря трофической, иммуномодуляторной активности, а также низкой иммуногенности. В настоящее время взаимодействие с клетками врожденного иммунитета, в особенности, «обратные эффекты» иммунных клеток на МСК, остаётся малоизученным. Моноциты играют ведущую роль в воспалительной реакции, регулируя реакции адаптивного иммунитета и способствуя активации иммуномодуляторных свойств МСК. В связи с этим изучение взаимодействия МСК с моноцитами представляется особенно актуальным. В данном исследовании особое внимание было уделено «двусторонним эффектам» в контексте этих взаимодействий. В исследовании использовали МСК из жировой ткани человека и моноциты (МН) из периферической крови здоровых добровольцев, полученные с помощью магнитной сепарации по антигену CD14. Для стимуляции МН использовали кондиционированную среду (КС), полученную в результате 72 ч. инкубации смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). КС содержала провоспалительные медиаторы, такие как ИЛ-8, ФНО-альфа и ИЛ-6.

Предварительно был проведен эксперимент для выбора оптимального способа активации МН. МН инкубировали в КС от СКЛ постоянно, либо преактивировали, в течение разных промежутков времени и в разном соотношении КС/ростовая среда. Каждые 24 ч. оценивали активацию и жизнеспособность МН. Исходя из полученных данных, было решено преактивировать МН в течение 24 ч. в среде от 3-дневной СКЛ в соотношении КС/полная ростовая среда 1:1. После преактивации МН отмывали и добавляли к МСК для контактного взаимодействия. В сокультуре поддерживалась высокая жизнеспособность МСК, не изменялся трансмембранный потенциал митохондрий МСК и внутриклеточное содержание АФК. Активность лизосомального компартмента МСК снижалась в 2 раза. При сокультивировании МСК с МН резко возрастал уровень ИЛ-6, ИЛ-4 и МСР-1, снижалась продукция ИЛ-8. В незначительных количествах были обнаружены ФНО альфа, MIG и ИЛ-10. После взаимодействия с МСК доля CD69+ МН снижалась, а экспрессия HLA-DR несколько увеличивалась. В 3 раза увеличивалась доля CD163+ МН и интенсивность экспрессии этого антигена, тогда как CD86 не экспрессировался. Описанные изменения цитокинового профиля и экспрессии поверхностных маркеров характерны для противовоспалительного фенотипа МН. Таким образом, при взаимодействии с клетками врожденного иммунитета жизнеспособность аллогенных МСК не снижалась, не изменялись функциональное состояние внутриклеточных компартментов и уровень АФК. При взаимодействии МСК проявляли выраженные иммуномодуляторные свойства и смещали фенотип МН в сторону противовоспалительного. Эти данные указывают на способность МСК модулировать процессы воспаления на ранних этапах, сохраняя при этом свое функциональное состояние.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Интегративная физиология» и Стипендии Президента РФ СП-3502.2015.4*

#### **Градов О.В., Яблоков А.Г.**

*ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе» РАН o.v.gradov@gmail.com*

#### **МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ НА ЧИПЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ И СИНТЕТИЧЕСКОГО МОРФОГЕНЕЗА**

Исследования дифференциации стволовых клеток на чипе, входящие в тренд с середины 2000-х гг. [1], привели к выводу о необходимости многофакторного исследования отклика в подобных системах, ведущего к девиациям в пролиферации и дифференциации клеток. Были предложены методики электробиофизического или цитозлектрофизиологического контроля, основанные на измерении импеданса и емкости [2, 3]. Последние реализуемы, в частности — в трассирующем определенных клетки режиме, на КМОП-чипах [3], однако в качестве аналитического сигнала выступает не оптический сигнал, как в КМОП-матрицах и оптических линейках, а электрофизические переменные. Нами в 2012 г. были внедрены КМОП-чипы / КМОП-лаборатории на чипе, на которых удавалось наблюдать гистогенез, регенерацию, а также экспериментальный морфогенез [4–7],

используя шпирен-методы и спекл-методы контроля под различными углами облучения и фиксации аналитического сигнала образца [7, 8]. В настоящей работе предлагается совместить электрофизические / электрофизиологические и оптические методы регистрации активности клеток на чипе, в частности — с использованием преобразователей электрофизических переменных редокс-сигналлинга в оптические переменные. Как показывает практика, для различных стадий и культур клеток, культивированных в различных условиях, а также различающихся по критериям направленной дифференциации, характерны корреляционно различающиеся совокупности сигналов отклика. Исходя из данных, приводимых в постере, предлагается, доказывается и демонстрируется возможность использования мультипараметрических и конвертирующих КМОП-лабораторий на чипе в качестве инструмента исследований в области экспериментальной регенеративной медицины и синтетического морфогенеза. В качестве одного из приложений гибридного анализа рассматривается планарный патч-кламп на чипе (планарная патч-кламп-спектрометрия), имплементируемый параллельно с оптической регистрацией, дающий возможность привязки данных о дифференциации клеток к данным функциональной каналомии развития.

#### *Литература:*

1. Ni X. F. et al. // *Microelectronic Engineering*. — 2008. — Т. 85. — № 5. — С. 1330-1333.
2. Lei K. F. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2014. — Т. 51. — С. 16-21.
3. Prakash S. B., Abshire P. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2008. — Т. 23. — № 10. — С. 1449-1457.
4. Нотченко А. В., Градов О. В. // *Журнал радиоэлектроники*. — 2012. — № 2. — Ст. 10.
5. Градов О. В., Нотченко А. В. // *Морфология*. — 2012. — Т. 6, № 1. — С. 5–19.
6. Notchenko A. V., Gradov O. V. // *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*. — 2013. — Vol. 2, no. 1. — DOI: 10.1615/visualizImageProcComputatBiomed.2013005968
7. Notchenko A. V., Gradov O. V. // *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*. — 2013. — Vol. 2, no. 1. — DOI: 10.1615/visualizImageProcComputatBiomed.2013005967
8. Oganessian V. A., Notchenko A. V., Gradov O. V. // *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*. — 2015. — Vol. 5, no. 3. — P. 75.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ, номер проекта 16-32-00914 До 2016 года работы велись в инициативном порядке без привлечения финансирования из фондов.*

#### **Грибанов И.И.<sup>1</sup>, Забелин М.В.<sup>1</sup>, Астрелина Т.А.<sup>1</sup>, Ульянов А.А.<sup>2</sup>, Покровский К.А.<sup>3</sup>, Сафонов А.С.<sup>1</sup>, Соколов А.А.<sup>3</sup>, Самойлов А.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России*

<sup>2</sup> *ЗАО «Центральная поликлиника Литфонда»*

<sup>3</sup> *Городская клиническая больница № 67 jan-caim@mail.ru*

#### **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДОЙ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКИХ АНАЛЬНЫХ ТРЕЩИН**

**ВВЕДЕНИЕ.** Лечение хронической анальной трещины остается одной из нерешенных проблем современной колопроктологии. Одним из методов

лечения является использование внутрисфинктерных инъекций ботулинического токсина, действие которого сохраняется в течение 4–8 мес., однако полное заживление анальной трещины происходит не у всех пациентов. Известно, что при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК) кондиционная среда (КС) обладает биологической активностью и может оказывать лечебное действие.

**ЦЕЛЬ.** изучение эффективности и безопасности лечения хронических анальных трещин ботулиническим токсином совместно с инстилляциями кондиционной средой мезенхимальных стволовых клеток (КС МСК).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включены 2 группы пациентов с хронической анальной трещиной: группа с КС МСК (108 пациентов: 67 женщин и 51 мужчина, средний возраст пациентов составил  $48.9 \pm 10.5$  лет) и контрольную группу (109: 58 женщин и 51 мужчина, средний возраст пациентов составил  $46,3 \pm 8,5$  лет). Пациентам группы с КС МСК проводилось лечение с использованием интрасфинктерного введения препарата ботулинического токсина с инстилляциями кондиционной среды МСК. Пациентам контрольной группы проводилось стандартная терапия. Проводили клинические, лабораторные и инструментальные методы исследования. Кондиционную среду для лечения собирали при культивировании МСК на 3–4 пассаже. Оценку МСК проводили согласно стандартам ISCT.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В результате лечения в течение 21 дня в группе пациентов с КС МСК отмечалось быстрое снижение болевого синдрома, нормализацией внутрианального давления и заживлением дефекта анодермы в течение 21 дня у 108 (93%) пациентов по сравнению с контрольной группой 76 (73,1%) ( $p = 0,03$ ). В течение 12 мес. после лечения положительные результаты сохранялись в группе с КС МСК у 78 (75,8%) пациентов по сравнению с контрольной группой у 64 (68,8%) ( $p = 0,048$ ). Неудовлетворительные результаты лечения (рецидив заболевания, наличие стриктуры анального канала, рубцовой деформации перианальной области, свищей, недержания газов и кишечного содержимого) наблюдались в группе с КС МСК у 3 (2,8%) пациентов по сравнению с контрольной группой у 8 (8,6%) пациентов ( $p = 0,047$ ). Нежелательных явлений и реакций у пациентов на инсталляцию КС МСК не отмечали.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, представлены результаты безопасности и эффективности лечения хронических анальных трещин ботулиническим токсином совместно с КС МСК.

**Григорьев Т.Е., Луканина К.И., Антипова К.Г., Загоскин Ю.Д., Крашенинников С.В., Чвалун С.Н.**

НИЦ «Курчатовский институт»  
timgrigo@yandex.ru

### **ВЫСОКОПРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Регенеративная медицина – наиболее активно развивающаяся область современной медицины. Трудно переоценить социальный и экономический эффект применения искусственных органов для трансплантации и тестирования новых лекарственных и косметических средств. Значительные успехи в молекулярной и клеточной биологии сместили медицинские методики в область восстановительной медицины. Однако предстоит решить еще множество задач. Одна из них это матрикс – «скелет» будущего органа или ткани. Применение матриксов натурального происхождения, аллогенных или ксеногенных, вызывает ряд технических и юридических проблем иммунного ответа, источника исходного биоматериала, возможных проблем с биомеханикой матрикса. Разработка синтетического матрикса позволит решить эти проблемы и довести операции с применением таких клеточных продуктов до рутинного уровня. Матрикс должен быть изготовлен из биосовместимого разлагаемого или неразлагаемого природного или синтетического полимера, иметь соответствующую морфологию и настраиваемые физико-химические и механические характеристики. С применением технологий сублимационного формования была проведена разработка получения высокопористых материалов на основе биоразлагаемых полимеров природного (хитозан, коллаген) и синтетического (полилактид) происхождения. Путем варьирования параметров кристаллизации растворителя перед сублимационной сушкой были получены материалы с диаметром пор от 20 до 120 мкм. Применение методик температуроиндуцированного фазового расщепления позволило получить скаффолды с мультимодальным распределением по диаметру пор. Были получены материалы с анизотропными порами, изучено влияние морфологии и структуры материалов на их физико-механические и биологические свойства. Для выявления влияния молекулярной массы полимера на структуру и свойства использовали полилактиды с молекулярной массой 50–450 кДа, хитозаны с молекулярной массой 50–600 кДа. Степень кристалличности полилактида в полученных материалах была определена на основании данных дифференциальной сканирующей калориметрии. Обнаружено существенное изменение характера термограмм в случае пористых материалов. Степень кристалличности полимера в губчатых материалах при этом примерно одинакова и несколько ниже (32–40%), чем максимальная (50–55%) степень кристалличности поли-L-лактида. Степень кристалличности возможно определена режимом заморозки раствора перед сублимацией. Температура плавления снижается в случае пористых образцов.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 17-03-01361 и 15-29-01252.*

**Григорьева Е.В.<sup>1,2,3</sup>, Маланханова Т.Б.<sup>1,2,3</sup>,  
Сурумбаева А.<sup>1,2,4</sup>, Павлова С.В.<sup>1,2,3</sup>,  
Малахова А.А.<sup>1,2,3</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН  
evlena@bionet.nsc.ru

**СОЗДАНИЕ ПРОТОКОЛА НАПРАВЛЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В СРЕДНИЕ ШИПИКОВЫЕ НЕЙРОНЫ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТРАНСГЕНЕЗА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДАННЫХ КЛЕТОК**

Средние шипиковые нейроны (СШН) представляют основную массу нейронов стриатума, гибель которых приводит к тяжёлому генетическому нейродегенеративному заболеванию — болезни Хантингтона. Гибель СШН является конечным результатом сложных процессов, вызванных генетической патологией в гене Huntingtin (HTT), а именно, аномальным увеличением (экспансией) тринуклеотидных повторов CAG. Направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в узкоспециализированные типы нейронов даёт возможность изучать *in vitro* молекулярные механизмы развития нейродегенеративных заболеваний, а также использовать дифференцированные нейроны для тестирования различных химических соединений, являющихся потенциальными лекарственными препаратами. Для таких биомедицинских исследований необходим высокоэффективный, воспроизводимый, простой протокол дифференцировки, позволяющий нарастить в большом количестве узкоспециализированные типы нейральных клеток. Однако существующие протоколы направленной дифференцировки ИПСК в СШН являются долгими, трудоёмкими и дорогостоящими, что значительно затрудняет их использование. В данной работе мы разработали протокол дифференцировки ИПСК в ГАМКэргические СШН, позволяющий длительное время культивировать клетки в стадии предшественников СШН, что даёт возможность нарастить в большом количестве клетки, успешно переживающие криоконсервацию и значительно упрощающую использование данного протокола. Более того, нами впервые показано при помощи технологии редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9, что предшественники СШН успешно поддаются трансгенезу, что открывает новые перспективы использования СШН с модифицированным геномом в биомедицинских работах.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-10128.*

**Гридина М.М.<sup>1</sup>, Матвеева Н.М.<sup>1</sup>,  
Фишман В.С.<sup>1</sup>, Мензоров А.Г.<sup>1</sup>, Кизилова Е.А.<sup>1</sup>,  
Ковригин И.И.<sup>1</sup>, Пристяжнюк И.Е.<sup>1</sup>,  
Никитина Т.В.<sup>2</sup>, Кашеварова А.А.<sup>2</sup>,  
Скрябин Н.А.<sup>2</sup>, Назаренко Л.П.<sup>2</sup>,  
Лебедев И.Н.<sup>2</sup>, Серов О.Л.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН  
gridinam@gmail.com

**НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА CNTN6 В НЕЙРОНАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТА С ЗР26.3 МИКРОДУПЛИКАЦИЕЙ**

Хромосомные перестройки занимают существенное место в развитии наследственной нейропатологии. Нами был описан пациент с недифференцированной умственной отсталостью, у которого методом array-CGH выявлена микродупликация 3p26.3. Для определения границ хромосомной перестройки было проведено полногеномное секвенирование и показано, что дублированный фрагмент хромосомы 3 с 560 685 п.о. по 1 504 678 п.о. (GRCh37/hg19). Микродупликация содержит полноразмерный ген CNTN6 плюс 600 т.п.о. 5'- и 50 т.п.о. 3'-последовательности. Каких-либо дополнительных структурных нарушений как в самом гене, так и во фланкирующих последовательностях не выявлено. Как делеции, так и дупликации CNTN6 связаны с развитием широкого спектра нейропатологий, включая задержку интеллектуального развития, заболевания аутистического спектра и синдром Туретта. Однако понимание механизмов их развития затруднено, так как, с одной стороны, нет адекватной модели на животных, а с другой, нет доступа к нейронам пациента, в которых экспрессируется CNTN6. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) позволяет создавать линии пациент-специфичных плюрипотентных клеток и дифференцировать их *in vitro* в нейроны. Из фибробластов пациента и двух здоровых доноров получены ИПСК, плюрипотентность которых была подтверждена в тератомном тесте. Дифференцировка ИПСК в нейрональные клетки *in vitro* была индуцирована сверхэкспрессией гена Ngn2, кодирующего транскрипционный фактор нейрогенин 2. Мы показали, что клетки, полученные дифференцировкой как ИПСК пациента, так и здоровых доноров, экспрессируют типичные нейрональные маркеры, включая бета-тубулин класса 3, нейрофиламент Н, MAP2, синаптофизин и PSD95. Функциональность полученных нейронов подтверждена электрофизиологическими тестами. Поскольку у пациента микродупликация затрагивает только ген CNTN6, логично предположить, что наблюдаемая клиническая картина развилась из-за нарушения экспрессии именно этого гена. Мы показали, что уровень экспрессии CNTN6 в нейронах с дупликацией, где по данным секвенирования присутствуют три полноценные копии гена, был существенно ниже, чем в нейронах, полученных из ИПСК здоровых доноров. Аллель-специфичный анализ экспрессии CNTN6 выявил в нейронах, полученных из ИПСК здоровых доноров, экспрессию обоих родительских аллелей. Однако экспрессия материнского аллеля оказалась незначительно,

но статистически значимо выше, чем отцовского. Пациент унаследовал микродупликацию CNTN6 от отца и уровень экспрессии дублированного аллеля был существенно ниже нормального. Наблюдаемое нами снижение экспрессии может объяснять сходство клинических симптомов, у пациентов с делециями и дупликациями гена CNTN6.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 14-15-00772-П.*

**Губарева Е.А.<sup>1</sup>, Куевда Е.В.<sup>1</sup>, Сотниченко А.С.<sup>1</sup>, Гуменюк И.С.<sup>1</sup>, Накохов Р.З.<sup>1</sup>, Чвалун С.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup> Курчатовский комплекс НБИКС-технологий НИЦ «Курчатовский институт»

g\_lena82@list.ru

### **ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ ОРТОТОПИЧЕСКИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДИАФРАГМЫ НА МОДЕЛИ КРЫСЫ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ** проблемы замещения дефектов диафрагмы связана с тем, что глубокие повреждение поперечнополосатой мускулатуры часто характеризуются невозможностью достижения регенерации, формированием грубоволокнистых рубцов, значительным нарушением функции. Тканеинженерный подход может избавить от необходимости использования несоответствующих аутологичных замещающих тканей или имплантации синтетических нежизнеспособных материалов.

**ЦЕЛЬ.** Создание функционирующей мышечной ткани на основе децеллюляризованного матрикса, рецеллюляризованного аллогенными мультипотентными мезенхимными стволовыми клетками (ММСК), для закрытия экспериментально смоделированного дефекта на модели крыс с последующим изучением потенциальной возможности и сроков восстановления функции мышечной ткани.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования проводились на 30 крысах — самцах линии Wistar при соблюдении надлежащих этических норм. Децеллюляризация диафрагмы осуществлялась детергент-энзиматическим методом в специально сконструированном биореакторе по описанным ранее протоколам с последующей комплексной оценкой качества получаемых матриксов. Получение ММСК костно-мозгового происхождения осуществляли стандартными методами. Статичная рецеллюляризация матриксов производилась в течение 3-х нед. в биореакторах, помещенных в CO<sub>2</sub>-инкубаторы. Рецеллюляризованные матриксы также комплексно оценивались *in vitro* при регистрации адгезии, жизнеспособности, пролиферации и дифференцировочного потенциала клеток на децеллюляризованном матриксе в динамике. Дефект диафрагмы моделировали хирургически путем удаления 80% левого купола с последующим ортотопическим замещением мышечной части рецеллюляризованным графтом. Через 21 день животным проводили функциональные исследования, включающие в себя спирометрию, электромиографию, рентгенологическое исследование, компьютерную томографию, изучение газового состава крови и кислотно-щелочного баланса, морфологическое исследование эксплантированного графта.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Проведена рецеллюляризация полученных ацеллюлярных матриксов аллогенными ММСК с созданием тканеинженерной конструкции (ТИК). Для оценки соответствия конструкции полноценно функционирующей диафрагмальной мышце проведена оценка восстановления барьерной функции между грудной и брюшной полостью (характеристика биомеханических свойств ТИК, отсутствие пневмоторакса, нормальное расположение оси сердца, отсутствие выпячиваний и инвентраций). Помимо проведенных компьютерной томографии и рентгенологического исследования для оценки вышеупомянутых параметров, выполнено принципиально важное для восстановления функциональных свойств ТИК изучение контрактильных свойств при регистрации электромиограммы, что необходимо для осуществления активного дыхания. Таким образом, ТИК диафрагмы крысы, полученная предлагаемым способом, воспроизводит свойства нативного органа и перспективна с точки зрения клинического применения после проведения дальнейших исследований на модели крупных лабораторных животных.

Финансирование исследования: *Комплексная НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоральных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».*

**Гуменюк И.С., Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Куевда Е.В., Гуменюк С.Е., Накохов Р.З.**

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России meklon@gmail.com

### **АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Оценка качества полученных образцов является актуальной проблемой, возникающей при создании тканеинженерных конструкций. Основной задачей данного исследования была разработка оптимальной методики количественного анализа содержания белков внеклеточного матрикса (ВКМ) как в нативных тканях, так и в биологических каркасах после проведения децеллюляризации. В связи с тем, что современные исследователи все больше полагаются на автоматизированные способы компьютерного анализа, коллектив авторов разработал программное обеспечение (ПО) «Morphostain» на языке python для оценки содержания белков ВКМ. Данное направление представляется крайне перспективным, так как позволяет устранить ошибки, связанные с субъективным фактором, и значительно снизить нагрузку на персонал лаборатории.

**ЦЕЛЬ.** Разработка ПО для автоматизированного количественного морфометрического анализа биологических образцов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В основе разработанного алгоритма лежит метод цветовой деконволюции, позволяющий сегментировать каналы отдельных красителей на основании спектров их поглощения при анализе микрофотографий мультиокрашенных срезов, полученных в ходе иммуногистохимического анализа. После выделения канала DAB-хромогена, широко используемого в качестве системы детекции, программа выполняет автоматизированный морфометрический анализ с выделением областей с позитивным надпороговым окрашиванием. Данные, полученные

при сравнительном анализе серии образцов, статистически обрабатываются ПО и сохраняются в формате boxplot-диаграмм и табличных файлов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Разработанный метод был успешно протестирован на различных образцах тканей, включая сердце, легкие и другие ткани низших приматов и крыс. Были проведены эксперименты по анализу образцов высокодифференцированного эндометриального рака яичника. Разработанное ПО позволяет анализировать тысячи образцов в короткие сроки при условии корректного отбора срезов для последующей обработки. Алгоритм и документация были опубликованы под свободной лицензией GPLv.3.0 в открытом доступе (<https://github.com/meklon/morphostain>) и могут быть использованы другими исследователями.

Финансирование исследования: *ФГБОУ ВО Куб-ГМУ Минздрава России.*

**Гумерова Д.Р., Салахиева Д.В.,  
Камалов М.И., Абдуллин Т.И.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
dilka-gume@mail.ru*

#### **ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ КАТИОННЫХ ПОЛИАСПАРТАМИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК**

Полимеры аспарагиновой кислоты являются перспективной основой для создания систем доставки лекарств и биоматериалов благодаря их биосовместимости и варьировемым физико-химическим и биологическим свойствам. Ранее нами установлены зависимости структуры и характеристик катионных полиаспартамидов с различными аминокислотными и (гидрокси)алкильными боковыми группами, как переносчиков плазмидной ДНК [Salakhieva et al., 2017]. Образцы полиаспарагиновой кислоты и катионных полиаспартамидов (КАП) получали из полисукцинимидного предшественника, синтезированного в реакции термической поликонденсации L-аспарагиновой кислоты. Молекулярную массу (ММ) полимеров исследовали методами статического рассеяния света, вискозиметрии и электрофореза. ММ исследованных полимеров варьировала от 3.0 до 8.4 кДа. Разработан новый катионный амфифильный полиаспартамид путем одностадийной реакции полисукцинимиды с диамином. Установлено, что ДНК-связывающая активность КАП возрастает с повышением ММ полимеров. Получены полиплексы полиаспартамидов с модельной плазмидной ДНК pEGFP-N2. Стехиометрия полимер/ДНК для КАП (8.4 кДа) составила 1:1 по массе (N/P = 25). По данным динамического рассеяния света полиплексы представляют собой однородные катионные наночастицы (гидродинамический диаметр 77 нм, дзета-потенциал +45 мВ), устойчивые к спонтанной агрегации. Образцы катионных полиаспартамидов, как и эквивалентные образцы полиаспарагиновой кислоты, не обладают цитотоксичностью для клеток линии НЕК-293 (IC50 << 1 мг/мл). На примере КАП (8.4 кДа) показано, что катионные полиаспартамиды не проявляют гемолитического действия, по меньшей мере, в концентрации 1 мг/мл, что указывает на их низкую мембраноповреждающую способность. По данным флуоресцентной микроскопии КАП (8.4 кДа) обладает высокой трансфекционной активностью в отношении клеток НЕК-293, соизмеримой с активностью коммерческого реагента TurboFect. При этом

разработанный полиаспартамид вследствие низкой цитотоксичности не требует промывки клеток после трансфекции. Установленные свойства катионных полиаспартамидов свидетельствуют о перспективе их применения для внутриклеточной и внутритканевой доставки терапевтических плазмид, стимулирующих регенерацию тканей. Salakhieva, D. et al. IntJPharm, 2017, V.517, P.234-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.007>

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

**Гурьянов И.Д., Науменко Е.А., Львов Ю.М.,  
Фахруллин Р.Ф.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
igurjano.27@mail.ru*

#### **НАНОМОДИФИЦИРОВАННЫЕ БИОПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

В современном мире спрос на замену утраченных или поврежденных тканей и органов большой и не может быть полностью удовлетворен трансплантацией донорского материала. В частности, трансплантации препятствует отсутствие полностью иммунологически совместимых тканей. Кроме того, существует проблема длительного ожидания донорских органов. В связи с этим, изготовление прототипов тканей, имеющих функциональные свойства, близкие к естественным, имеет решающее значение для эффективной трансплантации. Тканеинженерные конструкции обычно используются в качестве носителей, которые позволяют клеткам образовывать тканеподобные структуры, необходимы для правильного функционирования клеток в условиях, близких к трехмерным тканям. Недавно сформулированная новая парадигма названная «наноархитектоника», предлагает новый дизайн и изготовление тканеинженерных материалов с использованием динамической гармонизации на атомном/молекулярном уровне, химическую нанобработку, самосборку и позволяет создавать высокофункциональные материалы. Несмотря на то, что были предложены подходы, использующие различные полимеры для имитации природных условий для развития и роста клеток и тканей, универсальное решение для изготовления биосовместимых тканевых матриц все еще не отсутствует. В нашей работе показано формирование биополимерного пористого носителя на основе хитозана и агарозы и желатина, допированного нанотрубками минерала галлуазита. Добавление 3–6% нанотрубок позволило нам увеличить механическую прочность пористых матриц, что было определено с использованием динамического механического анализа и измерения прочности на растяжение. Кроме того, нами было выявлено, что добавление галлуазита увеличивает влажёмкость материала. Для оценки биосовместимости матриц *in vitro* мы использовали два типа раковых клеток человека (A549 и Hep3B). Клетки высевали на пористые подложки, обеспечивая подходящую поддержку роста и пролиферации клеток. Комбинация красителей флуоресцеиндиацетат и DAPI были ис-



пользованы для демонстрации распределения клеток на матриксах. Сканирующая электронная микроскопия и 3D конфокальная визуализация позволили выявить, что клетки эффективно прикрепляются к исследуемым матриксам, обрастая стенки пор, с сохранением характерной клеточной морфологии. Биологическую совместимость бионаноконструкций *in vivo* изучали на лабораторных крысах. Матрицы имплантировали подкожно; через 3 нед. с помощью лазерной доплеровской флоуметрии было выявлено, что происходило восстановление кровотока в области имплантации, что также было подтверждено гистологически. Анализ гистологических срезов через 6 нед. выявил полную резорбцию материала матрикса. Кроме того, нами было изучено распределение нанотрубок, входящих в состав матрикса, в области имплантации и в основных органах методом усиленной темнопольной микроскопии. По предварительным данным нанотрубки не распределялись по организму, а задерживались в области имплантации, однако данный вопрос требует более детального изучения.

Финансирование исследования: *Эта работа была частично поддержана грантом РФФИ № 17-04-02182 и выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

**Давлетшина Г.И.<sup>1,2,3</sup>, Шерстюк В.В.<sup>1,2,3,4</sup>,  
Закиян С.М.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup> ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России Минздрава России

<sup>4</sup> ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН davlet15628@gmail.com

**НАПРАВЛЕННОЕ ВНЕСЕНИЕ ДЕЛЕЦИЙ  
В ГЕНОМ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИЙ МИКРОРНК  
В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ  
К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ**

МикроРНК (миРНК) — это малые некодирующие РНК, которые участвуют в регуляции экспрессии генов во всех типах клеток. Основная функция миРНК — посттранскрипционная регуляция экспрессии генов. Неоднократные исследования доказывают, что некоторые миРНК участвуют в поддержании плюрипотентности и в перепрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию. Поиск новых факторов, участвующих в перепрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию, является неотъемлемой частью фундаментальных исследований. В настоящее время эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) составляет не более 1% от исходной популяции соматических клеток. Открытие и применение новых факторов позволит более тонко регулировать процесс перепрограммирования клеток к плюрипотентному состоянию и эффективнее получать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Лабораторная крыса одна из самых используемых животных моделей в экспериментальной медицине. Получение плюрипотентных клеток крысы дает новые возможности выведения трансгенных линий крыс и использование их в медицинских, токсикологических и фармакологических исследованиях. К тому же, в связи с развитием трансляционной медицины, потребность в изучении ИПСК данного модельного животного возрастает. Изучение ИПСК крысы позволит более эффективно проводить исследования, связанные с применением ИПСК в лечении некоторых заболеваний. Данная работа посвящена получению делеций локусов, содержащих сгруппированные гены миРНК, расположенные на X-хромосоме лабораторной крысы. Ранее нами было установлено, что миРНК: miR-743a, miR-743b, miR-742, miR-883, miR-471, miR-3551, miR-741, miR-463, miR-880, miR-878, miR-881, miR-871, miR-3580, miR-465 — активно транскрибируются в плюрипотентных клетках, но их экспрессия в фибробластах отсутствует. Для выяснения роли данных миРНК в процессе перепрограммирования к плюрипотентному состоянию мы провели нокаут этих миРНК в фибробластах крысы. Для получения нокаута мы использовали систему CRISPR/Cas9, состоящую из двух направляющих РНК и позволяющую вносить протяженные делеции в геном. В настоящем исследовании мы получили линии клеток с делециями пяти участков, длиной от 3 т.п.н. до 45 т.п.н., в которых закодированы сгруппированные гены исследуемых миРНК. В дальнейшем планируется провести перепрограммирование полученных линий клеток для изучения влияния исследуемых миРНК на процесс перепрограммирования. Полученные результаты позволят расширить знания в области плюрипотентных стволовых клеток и участия миРНК в регуляции данного явления.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФ № 16-14-10084.*

**Давыдов Д.Г.**

НКО «Ассоциация ветеринарной регенеративной и инновационной медицины»  
vetrynary@mail.ru

**РЕКОНСТРУКЦИИ РУБЦОВ  
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ  
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
ЖИРОВОЙ ТКАНИ**

ВВЕДЕНИЕ. Широкое использование мультипотентных стромальных клеток (МСК) в регенеративной медицине обусловлено доступностью материала для выделения и культивирования этих клеток. МСК обладают рядом уникальных свойств, таких как: высокая пролиферативная способность в культуре, достаточно высокий дифференцировочный потенциал, хоуминг, а также иммуносупрессия, которая позволяет использовать аллогенные МСК в трансплантологии.

ЦЕЛЬЮ данной работы являлось исследование возможности применения аллогенных МСК, выделенных из жировой ткани (ЖТ) для реконструкции рубцов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. МСК были выделены из ЖТ лошадей. Культивированные адгезивные клетки были охарактеризованы по цитофенотипическим признакам. На модели лошадей был проведен эксперимент. В область каждого рубца со сроком давности один год была введена суспензия МСК в среде DPBS, содержащая 1 млн клеток. Локализация рубцов: шея. За динамикой изменений следили

в течение 4 нед. Каждую неделю производили замер толщины рубцов и площадь повреждений штангенциркулем. Перед трансплантацией МСК в рубцовую ткань и через 4 нед. после введения, проводили морфологические исследования на гистологических срезах.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Толщина рубцов при замере до введения МСК составляла в среднем  $3,45 \pm 0,05$  мм. Средняя площадь рубцов  $5,7 \pm 0,5$  см<sup>2</sup>. На 28-й день средняя толщина составила  $2,85 \pm 0,05$  мм и площадь  $4,6 \pm 0,5$  см<sup>2</sup> соответственно. До введения суспензии МСК морфология рубца представляла следующую картину: ткань почти повсеместно представлена фиброзированной рубцовой тканью, выявлялись тяжи коллагеновых волокон, сокращение количества сосудов, воспалительных процессов не обнаружено. Эпидермис истончен, с уменьшением шиповатого и зернистого слоев, увеличено количество ороговевающих слоев эпидермиса. Отсутствие придатков кожи (сальных желёз и волосяных фолликулов). Через 4 нед. после трансплантации МСК морфологическая картина была следующей: в биоптатах отмечалась полная эпидермизация раневой поверхности с равномерной толщиной эпидермиса. При этом гистологическая структура эпидермиса не нарушена, имеются все слои с правильным соотношением (базальный, зернистый, шиповатый). В дерме на месте повреждения определяется зрелая рубцовая ткань с небольшим количеством сосудов капиллярного типа, расположенных неравномерно. Придатки кожи (сальные железы и волосяные фолликулы) распределены неравномерно, имеются единичные кистозно расширенные выводные протоки сальных желёз.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** На 28 день после трансплантации МСК в рубцовую ткань наблюдали уменьшение толщины рубцовой ткани и площади поражения, а также появились придатки кожи и нормализовалась гистологическая структура эпидермиса. Данные исследования доказывают, что трансплантация аллогенных МСК, выделенных из жировой ткани в область рубца, способствуют его реконструкции.

Финансирование исследования: *НКО «Ассоциация ветеринарной регенеративной и инновационной медицины» ООО «Чистый Город» Городской ветеринарный лечебно-диагностический центр № 1.*

**Дашинимаев Э.Б.<sup>1</sup>, Артюхов А.С.<sup>2</sup>,  
Абдыев В.К.<sup>3</sup>, Мещерякова Н.В.<sup>4</sup>,  
Василенко Ю.С.<sup>1</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>1</sup>,  
Васильев А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт биологии развития РАН  
им. Н.К. Кольцова*

<sup>2</sup> *Московский физико-технический институт*

<sup>3</sup> *МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>4</sup> *Российский университет дружбы народов  
dashinimaev@gmail.com*

#### **МОДЕЛИРОВАНИЕ СИНДРОМА ДАУНА IN VITRO ПРИ ПОМОЩИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И СВЯЗЬ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

Синдром Дауна (СД) является самой распространенной генетической патологией и одной из самых больших биомедицинских проблем 21-го века. Также данный синдром является уникальной моделью дисбаланса экспрессии генов, с подробной медицинской базой описания различных фенотипических проявлений данного дисбаланса и следующих за

ними патологиями. Так, например, люди с СД составляют крупнейшую популяцию людей с наследственной предрасположенностью к таким тяжелым заболеваниям как ранняя болезнь Альцгеймера, острый миелоидный лейкоз, врожденная сердечная недостаточность. Для изучения механизмов возникновения дисбаланса экспрессии генов необходимы корректные клеточные модели *in vitro*, причем ввиду разницы транскрипционного ландшафта в разных тканях и органах, необходимо иметь возможность получения различных клеточных культур из одного генетически связанного источника. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) являются хорошей фундаментальной базой для подобного рода исследований. В данной работе мы поставили перед собой цель изучить возможность создания клеточной модели СД на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от доноров с трисомией 21-й хромосомы (T21), воспроизводящей патологические процессы характерные для СД. Для этого мы репрограммировали несколько культур клеток амниотической жидкости человека с СД до плюрипотентного состояния с получением нескольких линий ИПСК, которые затем дифференцировали в нейральном направлении. С целью доказательства состоятельности нейральной дифференцировки, полученные культуры клеток мы протестировали несколькими независимыми методами, включая измерение специфической электрофизиологической активности нейронов методом патч-клампа. В результате мы показали, что нейральные T21 клетки обладают патологическим метаболизмом бета-амилоида по сравнению со здоровым контролем, выражающимся в повышенной секреции и накоплении гранул патологической изоформы бета-амилоида bA-42 в культуре клеток *in vitro*, а также повышенной экспрессией генов, связываемых с болезнью Альцгеймера. Полученные результаты были нами подтверждены также на модели трехмерных нейроэктодермальных органоидов, получаемых из ИПСК. Органоиды полученные из ИПСК-T21, по сравнению со здоровым контролем показали увеличенную секрецию бета-амилоидов (bA-40 и bA-42) и повышенные темпы апоптоза. Также нами был проведен анализ транскриптомов культур нейронов с T21 в сравнении с культурами нейронов с нормальным кариотипом, который показал наличие дисбаланса экспрессии генов и позволил определить перспективу поиска факторов возникновения данной патологии. Таким образом нами было показано, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки с трисомией 21-й хромосомы можно использовать в качестве основы для клеточной модели синдрома Дауна *in vitro*. Учитывая тот факт, что ИПСК обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и позволяют масштабировать данную модель до размеров, необходимых для проведения объемных фармацевтических исследований, данные клетки можно также использовать как тест-систему скрининга ответствующих лекарственных препаратов.

Финансирование исследования: *Работа была проведена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН 0108-2016-0005.*

**Дементьева Е.В.<sup>1-3</sup>, Медведев С.П.<sup>1-4</sup>,  
Елисафенко Е.А.<sup>1-3</sup>, Вяткин Ю.В.<sup>5</sup>,  
Штокало Д.Н.<sup>5</sup>, Байрамова С.А.<sup>2</sup>, Кретов Е.И.<sup>2</sup>,  
Покушалов Е.А.<sup>2</sup>, Караськов А.М.<sup>2</sup>,  
Закиян С.М.<sup>1-4</sup>**

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр  
«Институт цитологии и генетики» СО РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.  
акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
Минздрава России

<sup>3</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>5</sup> ООО «Новые программные системы»

e-mail: dementyeva\_elena@mail.ru

### **МОДЕЛИРОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: УСПЕХИ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной смертности населения в большинстве стран мира, поэтому разработка эффективных методов их терапии — одна из наиболее актуальных задач современной биомедицины. Несмотря на достигнутые успехи в лечении ССЗ, по-прежнему остается нерешенной проблема получения адекватных модельных систем для исследования механизмов ССЗ и тестирования потенциальных лекарственных препаратов. Технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей направленной дифференцировкой в кардиомиоциты открывает новые возможности для получения пациент-специфичных кардиомиоцитов и моделирования, по крайней мере, наследственных ССЗ. В настоящее время с помощью данного подхода были получены кардиомиоциты пациентов, страдающих такими наследственными ССЗ, как синдром удлиненного интервала QT, катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия, наследственные кардиомиопатии. Во всех случаях была показана способность пациент-специфичных кардиомиоцитов воспроизводить основные свойства исследуемых заболеваний *in vitro*, что подтверждает перспективность использования данного метода в биомедицине.

В докладе будут обсуждаться успехи в применении технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей направленной дифференцировкой в кардиомиоциты для моделирования наследственных ССЗ, а также проблемы, которые предстоит решить для дальнейшего внедрения данной технологии в биомедицину. Кроме того, будут представлены результаты, полученные авторским коллективом в процессе создания клеточных моделей врожденного синдрома удлиненного интервала QT и наследственной гипертрофической кардиомиопатии с помощью пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

**Демина Т.С.<sup>1</sup>, Бардакова К.Н.<sup>2,3</sup>,  
Минаев Н.В.<sup>2</sup>, Тимашев П.С.<sup>2,3</sup>, Аكوпова Т.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт синтетических полимерных  
материалов им. Н.С. Ениколопова РАН

<sup>2</sup> ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины,  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
detans@gmail.com

### **МАТРИКСЫ С ЗАДАННОЙ АРХИТЕКТУРОЙ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА С ОЛИГОЛАКТИДАМИ: ЛАЗЕРНАЯ МИКРОСТЕРЕОЛИТОГРАФИЯ**

Создание матриксов с заданной архитектурой является важным и активно развивающимся направлением в тканевой инженерии. Архитектура матрикса, который используют в качестве подложки для роста клеток, во многом определяет успешность формирования замещающей ткани. Одним из наиболее перспективных методов получения материалов с заданной 3D архитектурой является лазерная стереолитография, основанная на послойной локальной полимеризации или сшивки компонентов фоточувствительной композиции. Использование установок для стереолитографии, основанных на эффекте двухфотонного поглощения, позволяет получать материалы с субмикронным разрешением и иммобилизовать термочувствительные компоненты (белки, клетки и т.д.) в процессе формирования матрикса [M.T. Raimondi, et. al. // J. Appl. Biomater. Biomech. 2012, 10, 55–65.]. Работа посвящена получению гидрогелей с заданной 3D архитектурой на основе сополимеров хитозана с олиголактидами методом лазерной микростереолитографии. Хитозан — продукт деацетилирования хитина — является перспективным биodeградируемым и биосовместимым полимером для получения различных материалов биомедицинского назначения, в т.ч. для тканевой инженерии [F. Croisier, et. al. // Eur. Polym. J. 2013, 49, 780–792.]. В настоящей работе для повышения эффективности хитозана в качестве основы фоточувствительной композиции для лазерной стереолитографии были получены сополимеры хитозана с различной длиной привитых цепей олиголактидов [T.S. Demina, et. al. // HighEnergyChem. 2016, 50, 389–394.; T.S. Demina, et. al. // Polymers. 2017, 9(7), 302]. Введение фрагментов олиголактидов в химическую структуру хитозана позволяет регулировать свойства материалов на его основе (в т.ч. скорость ферментативного гидролиза, биосовместимость) и способность к переработке с помощью различных технологий [T.S. Demina, et. al. // IOPConf. Ser. Mater. Sci. Eng. 2015, 87.; T.S. Demina, et. al. // J. Appl. Polym. Sci. 2017, 134, 13.]. Показано, что в зависимости от макромолекулярных характеристик сополимеров (в т.ч. длины и стереохимического состава привитых цепей олиголактидов) их реакционная способность под действием фемтосекундного лазерного излучения и свойства получаемых 3D гидрогелей существенно различаются. Сополимеры, содержащие фрагменты олиго(L,D-лактида) со степенью полимеризации до 70, обладают наиболее широким диапазоном параметров проведения процесса (расстояние между линиями и слоями) для получения воспроизводимых структур, что позволяет регулировать микротопографию поверхности и степень набухания гидрогелей. Полученные 3D гидрогели полностью воспроизводят цифровую модель

и обладают механическими характеристиками, достаточными для использования в регенерации мягких тканей.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (№ 15-02-06233-а).*

**Денисенко Т.В.<sup>1</sup>, Сорокина И.В.<sup>1</sup>, Животовский Б.Д.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet  
tanya.dntv@gmail.com

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МИТОТИЧЕСКОЙ КАТАСТРОФЫ И АУТОФАГИИ: НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

Устойчивость к программируемой гибели клеток (ПКГ) является одним из главных признаков злокачественной трансформации клеток. Митотическая катастрофа (МК) изначально определялась как один из видов клеточной гибели инициированный аберрантным митозом. Дальнейшие исследования показали, что МК не является отдельной формой гибели клетки, а скорее стадией, предшествующей клеточной гибели, после которой наблюдается апоптоз или некроз в зависимости от молекулярного фона клетки. В нашей работе МК была индуцирована в клетках рака прямой кишки НСТ116 дикого типа и нокаутного по 14-3-3 сигма белку ( $\sigma^{-/-}$ ) сублетальными дозами цитотоксических агентов доксорубицина (600 нМ) и кольцемида (0,1 мкг/мл). Для выявления путей ПКГ после развития МК были произведена оценка экспрессии одного из маркеров апоптоза, расщепленной формы PARP. В клетках НСТ дикого типа появление фрагментов PARP было более выражено после обработки кольцемидом в сравнении с доксорубицином и увеличивалось со временем после индукции МК. В клетках НСТ116  $\sigma^{-/-}$  эффект развивался раньше, чем в клетках дикого типа, при обработке кольцемидом. В процессе анализа последствий МК было обнаружено, что клеточный стресс, вызываемый кольцемидом и доксорубицином, может вызывать не только апоптоз, но и аутофагию. Дальнейший анализ выявил накопление второй формы белка LC3 и расщепление p62 в обеих клеточных линиях. При этом аутофагия была более выражена в клетках НСТ116  $\sigma^{-/-}$ . Оба процесса, апоптоз и аутофагия, регулируются балансом про- и анти-апоптотических белков семейства Bcl-2. Поэтому мы исследовали влияние белков семейства Bcl-2: Bcl-XL и Mcl-1 на развитие апоптоза и аутофагии после индукции МК в клетках НСТ116 дикого типа и НСТ116  $\sigma^{-/-}$ . При стимуляции МК уровень апоптоза в клетках НСТ116 дикого типа и НСТ116  $\sigma^{-/-}$  с повышенной экспрессией Bcl-XL-GFP и Mcl-1-YFP снижался. В то же время, трансфекция с Bcl-XL и Mcl-1 стимулировала аутофагию в обеих клеточных линиях. Таким образом, подавление апоптоза, вызванное повышенной экспрессией белков Bcl-XL и Mcl-1 при индукции МК, значительно стимулировало аутофагию в клетках НСТ116 дикого типа и НСТ116  $\sigma^{-/-}$ . Полученные данные доказывают, что стимулирование МК может приводить к двум процессам ПКГ: аутофагии и апоптозу. Для клеток с более высоким уровнем МК, преобладающим путем клеточной гибели будет аутофагия. Таким образом, развитие аутофагии при сти-

муляции МК может стать новым подходом для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Финансирование исследования: *грант РФФИ № 16-04-00527.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Болдырева М.А., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России  
doctorkote@gmail.com

**СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH РЕГУЛИРУЕТ ФУНКЦИИ РЕЗИДЕНТНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА**

В настоящее время получены убедительные экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о участии прогениторных клеток сердца (ПКС) в репаративных/регенеративных процессах в миокарде (Gudeet al., 2017), хотя точный механизм, через который это участие реализуется, не идентифицирован. Если первоначально считалось, что основным механизмом является их способность дифференцироваться в кардиомиоциты (Hoyashiet al., 2015), то более поздние работы свидетельствуют о важной роли паракринной активности – способности секретировать большое количество биологически активных соединений и высвобождают экзосомы, несущие уникальный набор микроРНК, регулирующих регенерацию и ангиогенез (Zhanget al., 2016). Открытым остается также вопрос об идентификации сигнальных путей, регулирующих выживаемость и регенеративные функции ПКС, что может способствовать определению новых мишеней для фармакологического воздействия на эндогенные регенеративные процессы.

**ЦЕЛЬ.** Изучить роль сигнального пути Notch в регуляции функций ПКС in vitro и после эпикардимальной имплантации в виде сформированных клеточных пластов (КП; cellsheet). Для активации сигнального пути Notch использовали гиперэкспрессию NICD и культивирование ПКС на культуральных чашках, покрытых лигандом Jagged 1. Для оценки стимуляции васкулогенеза in vivo после модуляции Notch сигналинга была использована модель подкожной имплантации ПКС в Матригеле. Для исследования системы Notchin vivo ПКС трансплантировали в виде КП, сформированных in vitro на термочувствительных культуральных чашках, на эпикардимальную поверхность сердца крысам после перевязки передней нисходящей коронарной артерии. Культивирование ПКС in vitro на чашках, покрытых Jagged 1 (лиганд Notch), способствовало высвобождению NICD и активации экспрессии генов-мишеней Notch (Hes и Hey). Активация сигнала Notch повышала экспрессию факторов транскрипции сосудистых клеток in vitro. Добавление в среду культивирования ингибитора  $\gamma$ -секретазы, предотвращало активацию сигнального пути Notch и васкулогенную дифференцировку ПКС. Подкожная трансплантация ПКС, гиперэкспрессирующих NICD, в Матригеле стимулировала его васкуляризацию, при этом только часть ПКС дифференцировалась в клетки новообразованных сосудов. Гистологический анализ срезов миокарда через 14 дней после эпикардимальной имплантации на область инфаркта клеточных пластов из ПКС

показал, что они формируют «новообразованную», хорошо васкуляризованную ткань на эпикардиальной поверхности миокарда левого желудочка. Часть трансплантированных ПКС мигрировала в миокард, проявляла признаки активации сигнальной передачи Notch (локализация NICD в ядре) и дифференцировки в эндотелиальном направлении. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация сигнального пути Notch может быть использована для стимуляции васкулогенного поведения ПКС и повышения терапевтических свойств тканеинженерных конструкций на их основе.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorkote@gmail.com

#### **ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В соответствии с рекомендациями регуляторных организаций Европейского Союза и США (EMA и FDA) для доклинических исследований терапевтической эффективности или специфической биологической активности биомедицинских клеточных препаратов стволовых/прогениторных клеток используют так называемые аналогичные клеточные препараты, полученные на основе аналогичных типов клеток у животных. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка методов выделения, культивирования и оценки свойств стволовых/прогениторных клеток животных.

**ЦЕЛЬ.** Разработать способ выделения прогениторных клеток сердца (ПКС) и оценка их васкулогенных свойств *in vivo*. Разработанный способ выделения основан на ретроградной перфузии изолированного сердца мыши по методу Лангендорфа. За счет создания избыточного давления в аорте перфузионный раствор (раствор Кребса-Хензелята и коллагеназа II) попадает в коронарные артерии. Проходя через коронарные сосуды, перфузионный раствор вызывает деструкцию межклеточного матрикса и приводит к межклеточному «разобщению» с образованием суспензии клеток. Полученная клеточная суспензия после градиентного центрифугирования использовалась для иммуномагнитной селекции с антителами к маркеру CD117 (c-kit). ПКС мыши имели сходный фенотип с прогениторными клетками сердца человека и характеризовались отсутствием маркеров гематопозитических клеток, экспрессией маркеров стволовых клеток (c-kit, sca-1) и, частично, урокиназного рецептора, CD90, CD73, Notch 1. Полученные клетки мыши были способны к клонообразованию, образованию сфероидов и мультипотентной дифференцировке *in vitro* в кардиомиоцитарном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях, что сопоставимо с характеристиками ПКС человека. Для оценки *in vivo* ангиогенных свойств получаемых клеток мыши была использована модель подкожной имплантации клеток в Матригеле (Matrigel™) экспериментальным мышам. Показано, что ПКС в со-

ставе Матригеля эффективно стимулируют его васкуляризацию, но только часть ПКС интегрировалась и дифференцировалась в клетки новообразованных сосудов, что указывает и на паракринные механизмы их ангиогенного действия. Разработанный нами способ выделения c-kit ПКС из миокарда грызунов позволяет получать клетки, которые обладают основными характеристиками прогениторных клеток сердца, проявляют васкулогенные свойства *in vitro* и *in vivo*. Получаемые ПКС аналогичны по своим свойствам c-kit ПКС из миокарда или ушка правого предсердия человека, и могут быть использованы при доклинической оценке эффективности биомедицинских клеточных продуктов на основе ПКС человека как аналогичный клеточный препарат.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01368.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Болдырева М.А., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorkote@gmail.com

#### **ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ РЕЗИДЕНТНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ВЫЗЫВАЕТ АКТИВАЦИЮ КЛЕТОК ЭПИКАРДА И СТИМУЛЯЦИЮ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗА В ЗОНЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ**

В последние годы активно развивается направление, связанное с трансплантацией резидентных прогениторных клеток сердца (ПКС), с целью активации репаративных процессов в постинфарктном миокарде. Однако механизмы регенеративного действия пересаженных клеток остаются малоизученными.

**ЦЕЛЬ.** Оценить состояние ПКС после интрамиокардиальной трансплантации и исследовать влияние клеточного имплантата на активацию васкулогенного пула клеток эпикарда. Крысам-самцам линии Вистар проводили перевязку передней нисходящей коронарной артерии и интрамиокардиальные инъекции CM-DIL+ ПКС (1 млн. клеток) или контрольной среды. Через 14 дней после трансплантации ПКС сохраняли жизнеспособность и часть клеток проявляла признаки эндотелиальной дифференцировки. Достоверных различий в размере площади рубца между группами выявлено не было (данные морфометрии). Однако трансплантация ПКС способствовала уменьшению выраженности негативного ремоделирования: статистически значимому уменьшению дилатации полости ЛЖ, распространенности трансмурального поражения, увеличению толщины рубца и количества артериол в перинфарктной зоне. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда показало достоверное увеличение количества Wt1+ прогениторных клеток эпикарда (ПКЭ) после трансплантации ПКС в сравнении с контрольной группой. ПКЭ мигрировали в миокард, часть из них коэкспрессировала маркеры CD31 (Pecam), гладкомышечный альфа-актин (SMA) и интегрировалась в новообразованные сосуды. Полученные результаты показывают, что интрамиокардиальная трансплантация ПКС способствует увеличению васкуляризации миокарда как за счет дифференцировки трансплантированных клеток, так и за счет активации васкулогенных

клеток эпикарда, а также уменьшает негативное ремоделирование, что может служить одним из показателей снижения риска развития постинфарктной сердечной недостаточности.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И.,  
Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С.,  
Болдырева М.А., Меньшиков М.Ю.,  
Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorokote@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА**

Сердце содержит пул низкодифференцированных стволовых/прогениторных клеток (ПКС), которые участвуют в поддержании клеточного гомеостаза в норме и при повреждении. Трансплантация ПКС рассматривается как перспективный метод поддержания и восстановления функциональной активности поврежденного миокарда (Gudeet al., 2017). Однако используемые способы доставки клеточного материала в виде инъекций суспензии клеток не позволяют избежать повреждения клеток и обеспечить хорошую выживаемость клеточного материала после трансплантации. Цель — сравнение эффективности трансплантации ПКС с помощью интрамиокардиального введения клеточной суспензии и эпикардиальной трансплантации в виде сформированных пластов клеток (ПК; cellsheet). Крысам-самцам линии Вистар проводили перевязку передней нисходящей коронарной артерии и проводили интрамиокардиальные инъекции CM-DIL+ ПКС или контрольной среды или эпикардиальную трансплантацию клеточных пластов ПКС (КП; cellsheet). Через 2 нед. после трансплантации количество сохранившихся меченых ПКС в группе инъекций было значительно меньше, чем в группе КП. При этом существенных различий в количестве клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации и апоптоза, при двух способах введения выявлено не было. ПКС, трансплантированные в составе КП, имели более выраженную миграционную способность (из области первичного введения) по сравнению с инъекционными клетками. Оба метода трансплантации ПКС вызывали статистически значимое уменьшение дилатации полости ЛЖ, увеличение толщины стенки в области рубца по сравнению с контрольной группой. Однако, достоверное уменьшение размера рубца было продемонстрировано только в группе трансплантации КП. Гистологический анализ показал, что трансплантация КП способствует формированию «новообразованной», хорошо васкуляризированной ткани. ПКС, трансплантированные с помощью обоих способов, проявляли признаки дифференцировки в эндотелиальном направлении. Однако васкулогенный потенциал ПКС был достоверно выше при эпикардиальной трансплантации ПКС в составе КП. Таким образом, трансплантация ПКС в виде КП является перспективным способом доставки прогениторных клеток в миокард, способствующим поддержанию их выживаемости/сохранности и функциональных свойств после введения.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-00181.*

**Дергилев К.В., Цоколаева З.И.,  
Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И.,  
Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
doctorokote@gmail.com

### **УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА – ВОЗМОЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР ФУНКЦИЙ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЦЕ**

Урокиназная система, состоящая из активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы — uPA), ее рецептора (uPAR) и ингибитора (PAI-1) является важнейшей системой, регулирующей основные функции клетки: направленную миграцию, пролиферацию, адгезию. Эта регуляция осуществляется через множество механизмов, включающих как регуляцию внеклеточного протеолиза и запуск протеолитических каскадов на поверхности клетки, так и внутриклеточные механизмы, обусловленные активацией множественных сигнальных каскадов. Несмотря на многочисленные исследования роли урокиназной системы в регуляции функций различных клеток, включая стволовые клетки, и тканей, касающихся прогениторных клеток сердца (ПКС) и миокарда крайне мало.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать экспрессию компонентов урокиназной системы (урокиназы и урокиназного рецептора) в миокарде мыши после инфаркта. Моделирование инфаркта миокарда (ИМ) проводили путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии у самцов мышей линии C57BL. В работе исследовали образцы здорового/неповрежденного миокарда и поврежденного сердца, полученного на 1, 3, 5, 7 и 14 сут. после инфаркта. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показано, что в неповрежденном миокарде компоненты урокиназной системы присутствуют только на поверхности единичных клеток (макрофагах и лейкоцитах), расположенных в интерстициальном пространстве между кардиомиоцитов. В острую фазу после ИМ происходит значительная инфильтрация зоны некроза клетками воспаления, экспрессирующими урокиназу (uPA), ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) и урокиназный рецептор (uPAR). На 3 день наблюдалось статистически значимое повышение количества резидентных прогениторных клеток сердца, характеризующихся наличием рецепторов CD117 и Sca-1 на поверхности, которые также несли uPAR. ПКС пролиферировали и коэкспрессировали маркеры дифференцировки в кардиальном/васкулогенном направлении. К 14 дню наблюдения количество CD117+uPAR+ и Sca-1+ uPAR+ ПКС клеток в зоне рубца и периинфарктной области снижается, что может указывать на окончание репаративного действия этих клеток. Отмечалось снижение количества uPA+ и PAI-1+ лейкоцитов/лимфоцитов, макрофагов в зоне некроза. Таким образом, острая фаза инфаркта миокарда характеризуется аккумуляцией в зоне инфаркта клеток воспаления, экспрессирующих на своей поверхности компоненты урокиназной системы, и прогениторных клеток сердца, экспрессирующих

рецептор урокиназы. Вероятно, повышение секреции урокиназы клетками воспаления является одним из механизмов активации направленной миграции ПКС в зону повреждения. Это указывает на перспективы генной терапии, основанной на экспрессии урокиназы в поврежденном миокарде, с целью привлечения в него эндогенных прогениторных клеток сердца.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 17-15-01368.*

**Джагаров Д.Э.**

*IPSC-LAB*

*ipsc-lab@mail.ru*

### **ВНЕДРЕНИЕ МИКРОЖИДКОСТНЫХ УСТРОЙСТВ И АВТОМАТИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЗАЛОГ ШИРОКОГО ВНЕДРЕНИЯ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

Одним из основных препятствий для широкого внедрения методов клеточной терапии и тканевой инженерии является чрезвычайная дороговизна производства биомедицинских клеточных продуктов, особенно, если этот продукт необходимо производить с учетом персональных особенностей каждого потребителя. Так, например, одобренная FDA суспензия Kymriah (CAR-T клетки) для лечения рака крови, будет изготовлена персонально для каждого отдельного пациента из его собственных клеток в фирме NovartisMorrisPlains, и поэтому лечение будет стоить порядка \$475,000. Такая цена делает лечение недоступным для подавляющего большинства пациентов. Как снизить цену и сделать подобные высокоэффективные препараты более доступными? Очевидно только путем резкого сокращения объемов культуральной жидкости, дорогих реагентов и за счет полной автоматизации процессов производства и контроля качества препаратов с помощью недорогих микрожидкостных устройств и роботизированных манипуляторов. Поэтому необходимо разработать системы автоматизированного анализа одиночных клеток аналогичные Cyto-Mine<sup>®</sup>, а также технологии редактирования генома в одиночных клетках. Производить подобные микрожидкостные устройства можно на 3D-принтерах, что облегчит оснащение ими малобюджетных лечебных заведений. Чтобы удешевить затраты на электронику подобных устройств можно делегировать некоторые задачи отдаленному центральному процессору с искусственным интеллектом, доступному через интернет. Необходимо также разработать материалы, минимально адсорбирующие различные вещества из жидкости (например, аналоги стирол-этилен-бутилен-стирола с низкой способностью адсорбировать малые гидрофобные молекулы). Кроме того, отработать методы 3D-дизэлектрофореза для быстрого разделения клеток крови, без использования дорогостоящих центрифуг, чтобы сразу приступить к редактированию генома выделенных клеток. Следует также создать центральный банк готовых векторов для трансфекции клеток пациентов. Все это осуществимо при хорошо продуманном распределении задач между партнерскими организациями.

**Трухачев В.И., Дилекова О.В., Квочко А.Н., Шпыгова В.М.**

*ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»*

*Dilekova2009@yandex.ru*

### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО (C-KIT/SCF-R) И МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ( $\alpha$ -SMA) АНТИГЕНОВ В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

В работе была исследована поджелудочная железа от 60 самцов крупного рогатого скота айрширской породы от суточного до 3-летнего возраста. Убой животных проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях и Совета от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. В исследованиях применяли моноклональные мышиные антитела к SCF-R (c-kit) (DiagnosticBioSystems, Нидерланды, 1:20 – 1:40), моноклональные кроличьи антитела к CD117/c-kit и моноклональные мышиные антитела к Actin-SmoothMuscle ( $\alpha$ -SMA) (SpringBioScience, США). У крупного рогатого скота от суточного до 3-месячного возраста в экзокринной паренхиме визуализируются кластеры из скопленных  $\beta$ -эндокриноцитов, между которыми отмечается неоваскулогенез капилляров, в стенке которых выявлена экспрессия  $\alpha$ -SMA+. На периферии кластеров располагаются клетки, экспрессирующие на плазмолемме c-kit+, что, по-видимому, является показателем незавершенности морфогенеза в первые месяцы постнатального развития поджелудочной железы. Также экспрессия c-kit+ идентифицируется в клетках, расположенных по периферии эндокринных островков на одном из полюсов, в единичных эпителиоцитах межацинозных выводных протоков, в экзокринных панкреатоцитах панкреатических ацинусов. В 6-месячном возрасте происходит увеличение количества клеток от 4 до 6 с иммунореактивным материалом в межацинозных выводных протоках и продолжается до 1 года жизни животных. В 3 года c-kit+ визуализируется только в клетках эндокринных островков. Экспрессия  $\alpha$ -SMA+ отмечается в веретенообразных отростчатых клетках. С суточного до 3-летнего возраста  $\alpha$ -SMA+ постоянно идентифицируется в гладкомышечных клетках меди крупных сосудов, в мышечной оболочке междольковых выводных протоков. Также в суточном возрасте экспрессия антигена выявлена в стенке капилляров, окружающих эндокринные островки. В месячном возрасте регистрируется наличие  $\alpha$ -SMA+ в гладкомышечных клетках межацинозных выводных протоков и веретенообразных клетках соединительной ткани между панкреатическими ацинусами. С 3-месячного возраста и до 1 года жизни животного экспрессия  $\alpha$ -SMA+ выявляется только в гладкомышечных клетках мышечной оболочки междольковых выводных протоков и крупных кровеносных сосудов. В 1 год единичные клетки экспрессирующие данный антиген выявляются между эндокриноцитами эндокринных островков. В 3 года отмечается снижение экспрессии маркера в стенке сосудов микроциркуляторного русла. Таким образом, в постнатальном онтогенезе крупного рогатого скота в поджелудочной железе постоянно присутствует две популяции прогениторных стволовых клеток, которые детерминированы к дифференцировке в клетки определенных

линий. Кроме того, клетки предшественники экспрессирующие c-kit+ и  $\alpha$ -SMA+ маркеры в железе находятся не в стационарном состоянии, а в постоянном динамическом процессе, мигрируя между тканями экзокринной и эндокринной частей железы.

**Докукина Л.Н., Прохорова Ю.Н.**

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России  
luda.dokukina@yandex.ru

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК  
СОВМЕСТНО С РАННЕЙ НЕКРЭКТОМИЕЙ  
ПРИ ОЖОГАХ II–III СТЕПЕНИ У ДЕТЕЙ**

В исследование были включены 55 детей, находившихся на лечении в ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России в возрасте от 6 мес. до 10 лет с ожогами II–III степени на площади от 2% до 18% поверхности тела. В основную группу включены 45 пациентов: 27 мальчиков и 18 девочек у которых причиной ожогов у 88,8% послужила горячая жидкость, у 4,5% — пламя, контактные ожоги зарегистрированы у 6,7% детей. Они поступили в стационар на  $3,5 \pm 1,5$  сут. после травмы и прооперированы на  $3,8 \pm 1,2$  сут. В группу сравнения включены 10 пациентов: 6 мальчиков и 4 девочки в возрасте от 1 года до 4 лет с ожогами на площади от 2 до 15% поверхности тела. Среди них 8 пациентов получили ожоги кипятком, 2 пациента — контактные ожоги, все они были госпитализированы в стационар в день получения травмы. У пациентов основной группы на первом этапе с помощью дерматома забирали биоптат кожи толщиной 0,25–0,3 мм с площади 4,0–8,0 см<sup>2</sup>, который направляли в лабораторию клеточных технологий, где путем ферментативной обработки получали клеточную взвесь. Вторым этапом выполняли некрэктомию, осуществляли гемостаз, рану промывали физиологическим раствором хлорида натрия, а затем производили трансплантацию аутологичных клеток в аутосыворотке пациента совместно с фибриновым клеем «Ивисел» путем распыления при помощи специального устройства. Поверх на раневую поверхность с нанесенной клеточной взвесью накладывали индифферентное прозрачное покрытие и стерильные марлевые повязки. Первую перевязку производили через 5–6 сут., последующие — по мере необходимости. В группе сравнения лечение осуществляли консервативно: 1 раз в 2 дня производили перевязки с растворами антисептиков в сочетании с атравматичными повязками. Эффективность лечения оценивали при выписке, через 1, 3, 6 и 12 мес. по Ванкуверской шкале (Vancouver Scar Scale) и ДИКЖ (дерматологический индекс качества жизни). Сроки полной эпителизации ожоговых ран в основной группе у 43 пациентов (94,8%) составили  $9,5 \pm 1,6$  сут. В группе сравнения эпителизация ран у 5 пациентов (50%) завершилась через  $18,5 \pm 1,5$  сут., а у 5 (50%) на 5 сут. сформировался тонкий струп, секвестрация которого наступила на  $13,7 \pm 0,2$  сут. Таким образом, у 5,2% детей из основной группы и у 50% из группы сравнения сформировались гранулирующие раны на площади от 1 до 3% пов. тела. Всем им была выполнена свободная кожная пластика. По результатам катамнестического исследования в основной группе через 12 мес. у 88,8% отмечен хороший результат, у 11,2% — удовлетворительный, с образованием гипертрофического рубца.

В группе сравнения хороший результат зарегистрирован у 54,3%, удовлетворительный в 45,7% случаев. По данным ДИКЖ последствия ожоговой травмы незначительным образом повлияли на качество жизни пациентов в обеих группах.

Финансирование исследования: *Федеральный бюджет.*

**Докшин П.М.<sup>1</sup>, Малашичева А.Б.<sup>2</sup>,  
Карпов А.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова

<sup>3</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
p.docshin@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ПОТЕНЦИАЛ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА  
В РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА**

Развитие сердечной недостаточности по причине острого инфаркта миокарда сопровождается массовой некротической гибелью кардиомиоцитов в очаге повреждения и последующему патологическому ремоделированию пораженного участка миокарда. Восстановление сократительной функции сердца и регенерация миокарда после ишемического повреждения являются актуальными вопросами современной регенеративной медицины и клеточной биологии. Недавно были описаны эндогенные стволовые клетки сердца (СКС), имеющие регенеративный потенциал. СКС представляют собой гетерогенную группу клеток, распределенных по всему сердцу (в предсердиях, желудочках, эпикарде или в перикарде). Несмотря на открытие данных клеток, механизм активации СКС остаётся слабоизученным. Целью данной работы было получить СКС непосредственно из зоны инфаркта миокарда, сравнить их с СКС, полученными из участка здорового миокарда, по функциональным свойствам — скорости роста, способности к миграции и дифференцировке. Развитие инфаркта миокарда передней стенки правого желудочка сердца у крыс линии Вистар индуцировали перевязкой коронарной артерии. Через 3 дня из постинфарктного участка получали СКС путем ферментативной диссоциации ткани; в качестве контроля использовали участок здорового миокарда. Скорость пролиферации оценивали методом построения кривых роста. Скорость миграции оценивали методом нанесения царапины на монослой клеток и последующей оценкой миграции. Клетки дифференцировали в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Оценку степени дифференцировки проводили методом количественной ПЦР на специфические маркеры дифференцировки, а также окрашивали дифференцированные клетки иммуноцитохимическим методом на специфические маркеры. Постинфарктные клетки обладали более высоким пролиферативным потенциалом и имели большую склонность к миграции в область царапины, по сравнению с культурой здоровых клеток. По данным ПЦР уровень активации специфических маркеров дифференцировки (Tnnt2, BMP2, Runx2 и Fabp4) был более высоким у постинфарктных клеток. Таким образом, ишемическое воздействие на миокард при инфаркте приводит к активации внутренне-го регенеративного потенциала СКС in vivo.



**Долгушкин Д.А., Волова Л.Т., Тертерян М.А.,  
Болтовская В.В., Кулагина Л.Н.**

*Институт экспериментальной медицины  
и биотехнологий Самарского государственного  
медицинского университета Минздрава России  
dodipesa@yandex.ru*

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
И ПОИСК НОВЫХ ИСТОЧНИКОВ КЛЕТОЧНОГО  
КОМПОНЕНТА КОМБИНИРОВАННЫХ  
ТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ ХОНДРОПЛАСТИКИ**

Посттравматические и деструктивные полнослойные повреждения суставного гиалинового хряща представляют собой серьёзную проблему, так как, не будучи излеченными, они способствуют прогрессированию деструктивных процессов в суставе, в частности, развитию остеоартроза. Часто обнаруживаемые при выполнении артроскопических операций, эти дефекты хирурги либо игнорируют, либо выполняют малоинвазивные операции типа реваскуляризирующих остеоперфораций субхондральной кости и микрофрактурирования области повреждения. Ткань, заполняющая дефект суставной поверхности после подобных манипуляций, чаще всего не соответствует гиалиновому хрящу. Это несоответствие физических характеристик регенерата создает предпосылки для быстрого возникновения на этом месте нового дефекта. Хондропластика, то есть замещение дефектов хряща участками интактной хрящевой ткани, различными видами трансплантатов не находит широкого применения в клинике из-за сложности операционной техники, особенностей реабилитационного периода пациентов. Тем не менее, хондропластика — единственный метод, позволяющий при определенных условиях добиться регенерации органотипичной гиалиновой хрящевой ткани, либо получения гиалиноподобного регенерата в области дефекта суставной поверхности. Нами выполнены экспериментальные исследования на двух видах животных — кроликах породы Шиншилла и белых лабораторных крысах, у которых создавали модель двух посттравматических костно-хрящевых дефектов надколенниковой поверхности бедренных костей. Дефекты замещали комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами. В качестве бионосителя для клеток использовали деминерализованную спонгиозу «Лиопласт®». Клеточным компонентом являлись аутологичные и аллогенные хрящевые клетки, полученные из суставного и реберного хряща молодых особей заявленных видов животных. В динамике наряду с морфологическими исследованиями регенератов области дефекта, выполняли их исследование с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния. Обнаружена возможность замещения дефектов суставной поверхности у обоих видов животных органотипичной гиалиновой хрящевой тканью, что также подтверждал примененный физический метод. В ряде случаев наблюдали замещение дефектов гиалиноподобной тканью. Нами разработаны способы получения культур хрящевых клеток из человеческого суставного и реберного хряща разных локализаций. Новым источником получения ювенильных хрящевых клеток стали суставные поверхности детских пальцев, удаляемых при полидактилии (Патент РФ на изобретение № 2627817 от 11.08.2017). Нами изучены свойства и особенности культур клеток, полученных заявленным способом у детей разных возрастов. Куль-

туры клеток планируется использовать при создании комбинированных трансплантатов для хондропластики у людей.

**Домнина А.П.<sup>1</sup>, Новикова П.В.<sup>2</sup>,  
Обидина Ю.В.<sup>1</sup>, Никольский Н.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Медицинский факультет Санкт-Петербургского государственного университета  
aldomnina@mail.ru

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК  
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ  
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
МОДЕЛИ СИНДРОМА АШЕРМАНА**

Женское бесплодие является значимой проблемой в современной медицине. Одной из причин нарушения фертильности является синдром Ашермана. Под синдромом Ашермана подразумевается наличие в полости матки сращений, формирующихся в результате повреждения эндометрия при различных внутриматочных вмешательствах. Это приводит к гипо- или аменорее, бесплодию и невынашиванию беременности. Несмотря на успехи в лечении данной патологии с помощью гистероскопического рассечения сращений с последующей терапией эстрогенами, добиться восстановления репродуктивной функции удается не всегда. В настоящее время разрабатываются новые подходы к восстановлению функционально полноценного эндометрия у женщин с синдромом Ашермана, включая методы, основанные на применении мезенхимных стволовых клеток (МСК). МСК были выделены из различных тканей, таких как: костный мозг, жировая ткань, амниотическая жидкость, пупочный канатик, эндометрий, а также и из менструальной крови. Клетки костномозгового происхождения получили широкое распространение в течение последних 40 лет, однако их получение является инвазивным и связано с большим количеством осложнений. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия (эМСК), обладая всеми свойствами МСК из других источников, являются легкодоступными, обладают иммуномоделирующим и противовоспалительным действием. В данном исследовании на модели синдрома Ашермана у крыс (повреждение эндометрия 96% этанолом) была изучена возможность использования эМСК человека для коррекции экспериментальной модели синдрома Ашермана в сравнении с применением клеток костного мозга (ККМ). В группе животных, моделирующих синдром Ашермана, которым производилось введение фосфатно-буферного раствора, беременность не наступала. В группе животных, которым клетки вводились внутривенно, было отмечено восстановление фертильности у 25% особей, получавших инфузию эМСК и у 33% особей, которым вводились ККМ. При введении суспензии клеток в полость матки, как в группе животных, получавших ККМ, так и в группе, где производилось введение эМСК, наблюдалось восстановление фертильности у 50% животных. Таким образом, отмечалась более высокая частота наступления беременности у крыс при местном введении клеточного продукта на основе стволовых клеток, как эндометриального, так и костномозгового происхождения, по сравнению с таковым при внутривенной инфузии (50% по сравнению с 25% в группе, получавшей эМСК и 50% по сравнению с 33% в группе, получавшей ККМ).

Полученные данные свидетельствуют о способности эМСК оказывать влияние на восстановление структуры и функции эндометрия, сравнимое с таковым, достигаемым при введении ККМ. При малой инвазивности способа получения эМСК, достаточной изученности их свойств и доказанной безопасности применения, эМСК могут рассматриваться в качестве перспективного субстрата для использования в клинической практике, при нарушениях репродуктивной функции, связанных в частности, с синдромом Ашермана.

Финансирование исследования: *Программа Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» Грант РФФ № 14-50-00068.*

**Евсеева М.Н.<sup>1</sup>, Шишкина А.С.<sup>1</sup>, Шептулина А.Ф.<sup>2</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Клиника пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова  
mr.urfin-juice@yandex.ru

#### **ПОЛУЧЕНИЕ ХОЛАНГИОЦИТОВ, НЕСУЩИХ МАРКЁР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК LGR5**

Нарушение функций печени — пятая по частоте причина смерти в развитых странах. Единственным способом лечения этого состояния является пересадка. В связи с существенными ограничениями трансплантации необходимы новые подходы к терапии терминальных состояний печени. Получение аутологичных гепатоцитов для последующей трансплантации может быть одним из таких подходов. Мы разработали способ получения холангиоцитов из эксплантов желчного пузыря мышей. Данные клетки имеют маркёр, характерный для гепатобластов — Lgr5. Дальнейшая дифференцировка полученной культуры в гепатоциты позволит получать аутологичные клетки для терапевтических целей.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выделение эксплантных культур желчных пузырей проводили согласно описанной ранее методике с модификациями (Isolation of Neonatal Extrahepatic Cholangiocytes Sara Karjoo, Rebecca G. Wells). Мы оптимизировали среду, которая содержала: 5% FBS; 10% Stemcell supplement; инсулин 10 мкг/мл; пириват 1 мМ; пенициллин, стрептомицин, неомицин 100 мкг/мл; HEPES 200 мМ; MEM Vitamin Solution в разведении 1:100; L-glutamin 2 мМ; дексаметазон 4 мкг/мл; 3,3',5'-трийодо-L-тиронин 25 нг/мл; эпидермальный фактор роста (EGF), 25 нг/мл; форсколин 2,5 мкг/мл; фунгизон 500 нг/мл. Минимально необходимыми и достаточными компонентами для ведения культуры холангиоцитов оказались: форсколин, EGF, 3,3',5'-трийодо-L-тиронин. При использовании данной среды холангиоциты приобретали маркёр бипотентных гепатобластов Lgr5.

**МЕТОДЫ.** Мышам вводили изофлуран, в супинальной позиции делали U-образный разрез, кишечник смещали влево. Желчный пузырь пинцетом очищали от окружающей соединительной и жировой ткани и переносили в пластиковую чашку со средой. Экспланты трижды отмывали средой и переносили в чашку, покрытую слоем коллагена (2 мг/мл). Манипуляции с выделенным желчным пузырём проводили на льду. Затем экспланты покрывали слоем

коллагена и инкубировали в течении 45 мин. при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Далее добавляли среду для культивирования и инкубировали, меняя среду каждые 3 сут. Через две недели по краям экспланта наблюдали рост монослоя клеток. Монослой прикрепившихся клеток обрабатывали трипсином и рассаживали 1:4. Культуры вели в течение 10 пассажей, при этом клетки сохраняли морфологию. Клетки из монослоя рассаживали в новые чашки, предварительно покрытые коллагеном. После прикрепления и достижения монослоя клетки окрашивали антителами к Lgr5.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Мы оптимизировали протокол получения культуры холангиоцитов. Полученную культуру холангиоцитов характеризует экспрессия маркера овальных (бипотентных) клеток печени, Lgr5. Клетки активно пролиферируют более 10 пассажей. Дальнейшая дифференцировка полученной популяции клеток в гепатоциты возможно позволит получить аутологичные клетки для терапии терминальных состояний печени.

Финансирование исследования: *Грант РФФ № 14-15-00439 «Механизмы развития функциональной гетерогенности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека».*

**Егорихина М.Н., Алейник Д.Я., Левин Г.Я., Чарыкова И.Н., Соснина Л.Н., Давыденко Д.В.**

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России  
egorihina@rambler.ru

#### **СКАФФОЛД ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОЖИ**

Одной из основных задач тканевой инженерии является создание функциональных эквивалентов ткани или органа, для дальнейшей трансплантации их пациенту взамен поврежденных или утраченных. Решение поставленной задачи связано, прежде всего, с разработкой биodeградируемого внеклеточного матрикса, способного обеспечить достаточно временную механическую поддержку для развития ткани и создать условия для метаболизма и дифференцировки клеток, возможности васкуляризации и ремоделирования регенерирующей ткани.

**ЦЕЛЬ.** Разработка скаффолда на основе фибрина плазмы крови и коллагена для замещения дефектов кожи.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для формирования скаффолда (заявка на изобретение № 2017112424) использовали криопреципитат плазмы крови, полученной от здоровых доноров, коллаген I типа, тромбин, CaCl<sub>2</sub>, в качестве клеточного материала — дермальные фибробласты человека (4–6 пассаж), ММСЖ жировой ткани человека (3–4 пассаж). Исследование структуры скаффолда проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-IT300. Для контроля за ростом и пролиферацией клеток использовали методы световой, фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Разработан скаффолд для замещения дефектов кожи на основе фибрина плазмы крови и коллагена. Скаффолд характеризуется эластичностью, прозрачностью, стабильностью при инкубации в культуральной среде. Микроструктура имитируемого внеклеточного матрикса на поперечном срезе характеризуется пористостью, обусловленной сетчатым переплетением структурообразующих волокон.

Описанная структура обусловлена, прежде всего, фибриновой сетью, формирующейся при изготовлении скаффолда путем полимеризации фибриногена под действием тромбина и катионов кальция. Проведенные исследования образцов скаффолда показали отсутствие цитотоксического эффекта при культивировании культур клеток. Проведены эксперименты по различным способам формирования скаффолда: введение клеток на поверхность скаффолда после окончания процесса полимеризации композита и до полимеризации. Установлено, что иммобилизация клеток на поверхность конструкции после полимеризации композита недостаточно эффективна. Клетки хорошо адгезируются и распределяются по поверхности скаффолда, мигрируют в поверхностные слои, однако в глубокие слои проникают лишь единичные клетки. При введении клеток в состав композита до полимеризации, напротив, обеспечивается их равномерное распределение по всей толщине скаффолда и создаются оптимальные условия для формирования клеточной сети. Разработанные условия полимеризации композита позволяют включать клетки в состав скаффолда до его полимеризации, не оказывая влияния на их морфофункциональные характеристики. Установлено, что структура и состав разработанного скаффолда позволяют имитировать свойства внеклеточного матрикса как механически поддерживающей структуры и обеспечить условия для поддержания жизнеспособности клеток, их нормального роста и пролиферации в течение двух недель и более *in vitro*.

**Егоршина А.Ю.<sup>1</sup>, Копейна Г.С.<sup>1</sup>,  
Животовский Б.Д.<sup>1,2</sup>, Лаврик И.Н.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины,  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт медицины окружающей среды,  
Каролинский институт

<sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины,  
университет им. Отто фон Герике  
egorshina.aleksandra.2012@post.bio.msu.ru

### **РОЛЬ КАСПАЗЫ-2 В ГИБЕЛИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ПО ПУТИ МИТОТИЧЕСКОЙ КАТАСТРОФЫ**

Программируемая клеточная гибель — эволюционно-консервативный процесс, направленный на поддержание гомеостаза тканей организма. Апоптоз — генетически детерминированный тип гибели клеток, необходимый для контроля дифференцировки, морфогенеза и элиминирования клеток, подвергшихся химическому или радиационному воздействию, вирусной инфекции и опухолевой трансформации. Важную роль в осуществлении данного процесса играют белки семейства цистеиновых протеаз — каспазы. Один из членов этого семейства — каспаза-2 — активируется при повреждении ДНК и стрессе эндоплазматического ретикулума и уникальна тем, что сочетает в себе свойства как инициаторных, так и эффекторных каспаз. Было показано, что нарушение процесса митоза в условиях генотоксического стресса и последующее развитие митотической катастрофы приводит к активации каспазы-2, запуску каспазного каскада и клеточной смерти (Castedo, 2004). Дефицитные по каспазе-2 клетки устойчивы к митотическим ядам — винкристину, паклитакселю или колхицину. (Ho, 2008). Дефицит каспазы-2 в мышечных эмбриональных фибробластах усиливал

их геномную нестабильность и увеличивал процент анеуплоидных клеток после облучения (Dorstyn, 2012). Однако, молекулярный механизм регуляции каспазой-2 клеточной гибели по пути митотической катастрофы до конца неясен. Для изучения таких механизмов в клетках карциномы яичника Caov-4 была индуцирована гибель ДНК-повреждающим химиотерапевтическим препаратом доксорубицином в концентрации, вызывающей митотическую катастрофу. Цитометрический анализ с помощью метода Sub-G1 показал снижение уровня клеточной гибели в клетках, дефицитных по каспазе-2 в сравнении с диким типом. Полученные данные были подтверждены методом Вестерн-блота, который продемонстрировал в клетках, дефицитных по каспазе-2, снижение уровня активных фрагментов p19 и p17 каспазы-3 и, соответственно, уменьшение расщепления субстрата каспазы-3 — белка ПАРП (Поли (АДФ-рибоза)-полимераза). Измерение активности каспазы-2 с помощью флуоресцентного субстрата подтвердило активацию этого белка в клетках дикого типа при увеличении времени инкубации с доксорубицином. Более того, Вестерн-блот анализ продемонстрировал накопление ферментативно-активной формы каспазы-2 в клетках, обработанных доксорубицином, что свидетельствовало об её участии в процессе клеточной гибели. Необходимо отметить, что в нокаутных по каспазе-2 клетках наблюдалось существенное уменьшение уровня фосфорилирования гистона H2AX по остатку Ser139, который модифицируется при наличии повреждений ДНК. Нами установлено, что в условиях данной экспериментальной модели отсутствие каспазы-2 в клетке приводит не только к ослаблению клеточной гибели, но и влияет на механизмы детекции повреждений ДНК. Таким образом, каспаза-2 является важным регулятором клеточной гибели по пути митотической катастрофы.

Финансирование исследования: Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 16-04-00252.

**Елисеева Д.Д.<sup>1</sup>, Быковская С.Н.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр неврологии»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

<sup>3</sup> ООО «Регенекс»  
ddeliseeva@gmail.com

### **СОЗДАНИЕ АУТОЛОГИЧНОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА CD4+CD25+FOXP3+CD127- РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ, КЛИНИЧЕСКОЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРЕГ — КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ**

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, проявляющееся рассеянной неврологической симптоматикой и приводящее к стойкой инвалидизации людей молодого возраста. В поддержании иммунологической толерантности и развитии аутоиммунных заболеваний ключевую роль играют CD4+CD25+Foxp3+CD127- регуляторные Т-клетки (Трег), контролируя ответ на аутоантигены. По нашим данным больные РС имеют количественный и функциональный дефицит периферических Трег (пТрег), который обусловлен дефектом функ-

ции гена FOXP3. Абсолютное число пТрег, циркулирующих в крови больных РС, составляет  $45,7 \pm 20,7$  [8,7; 72,7] в 1 мкл, тогда как у здоровых доноров этот показатель находится на уровне  $77,8 \pm 21,0$  [35,8; 121,8] в 1 мкл. Дефицит пТрег имеет обратную корреляционную связь с длительностью заболевания и степенью инвалидизации больных РС. Кроме того, пТрег больных РС проявляют сниженную ингибиторную активность в отношении аутореактивных Т- и В-клеток. С целью коррекции несостоятельности пТрег больных РС, разработана методика создания собственного клеточного продукта Трег, который будет использоваться для Трег-клеточной терапии того больного, от которого эти клетки были получены. Методом магнитной сепарации выделяются CD4+ и CD4+CD25+ Т-клетки, которые культивируют в течение 7 дней в среде RPMI-1640 с добавлением сыворотки больного, ростовых и стимулирующих факторов. В результате индукции *ex vivo* более 95% CD4+ Т-клеток начинают экспрессировать маркеры, характерные для нативных Трег. Таким образом, мы получаем трансформированные Трег (тТрег), которые проявляют более высокую ингибиторную активность на клетки-мишени по сравнению пТрег больных РС. Готовый и маркированный клеточный продукт тТрег состоит из  $2,5 - 4,5 \times 10^8$  клеток/мл ( $4-7 \times 10^6$ /кг), 0,9% физиологического раствора, которые забираются в 2–3 шприца по 1 мл для последующего подкожного введения больному. На основании результатов проведенных нами пилотных исследований с включением тридцати пяти больных ремиттирующим РС, Трег – клеточная терапия, проводимая с интервалом в 3 месяца, демонстрирует клиническую эффективность, которая выражается в снижении среднегодовой частоты обострений РС на 72% по сравнению с исходным уровнем и стабилизацией показателя инвалидизации больных. Иммунологический эффект регистрируется после каждой инъекции клеточного продукта тТрег виде увеличения абсолютного числа пТрег на 30–50% в крови больных РС. Трег – клеточная терапия имеет хороший профиль безопасности и переносимости, не вызывая значимых местных, системных и соматических реакций, изменений лабораторных показателей и общего состояния здоровья. Таким образом, разработанный инновационный метод получения масштабных количеств тТрег, способных компенсировать количественный и функциональный дефект пТрег больных РС, предотвращая прогрессирование заболевания, составляет основу персонализированной таргетной Трег – клеточной терапии, основанной на адоптивном переносе аутологичных Трег.

Финансирование исследования: *Инновационный центр «Сколково»*.

**Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Макаров А.В. Лохонина А.В.**

*ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России  
elchandrey@yandex.ru*

### **ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС**

У пациентов, которым произведена достаточно обширная резекция печени, или пересаженная донорская печень оказывается слишком малой для поддержания гомеостаза, развивается острая печеночная недостаточность. Данное состояние в онкологии и трансплантологии описывается в рамках синдрома «малого остатка органа». Считается, что тяжесть состояния у пациентов с синдромом малого остатка органа может усугубляться нарушением регенерации печени. На модели синдрома малого остатка печени (резекция 80% печени) изучена пролиферация гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. Обнаружено позднее начало пролиферации, а также наличие временных блоков митотического цикла. Предполагается, что причиной этого является блок митотического цикла при переходе из G0 в G1, и при выходе клеток из G2-периода. Полученные данные по экспрессии Ki67 частично подтверждают наличие блока митотического цикла при переходе G0 в G1, поскольку через 24 ч. полностью отсутствовали гепатоциты, экспрессирующие Ki67, то есть гепатоциты находящиеся в митотическом цикле. С другой стороны, в нашей работе не подтвердилось наличие блока митотического цикла при переходе из G2-периода на раннем этапе регенерации. Клетки, находящиеся в G2-периоде митотического цикла экспрессируют Ki67. При наличии блока митотического цикла в G2-периоде мы наблюдали бы накопление Ki67+ гепатоцитов в сочетании со сниженным митотическим индексом. Однако через 48 ч. после резекции мы наблюдали наибольшее количество Ki67+ гепатоцитов в сочетании с резким увеличением количества митотически делящихся гепатоцитов. Возможной причиной позднего начала пролиферации гепатоцитов является низкий уровень TNFα в регенерирующей печени. Таким образом, одним из ведущих механизмов нарушения регенерации в условиях синдрома малого остатка печени после резекции 80% тканей является нарушение пролиферации гепатоцитов.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-15-01419)*.

**Самчук Д.П.<sup>1</sup>, Пулин А.А.<sup>2</sup>, Еремин И.И.<sup>2</sup>,  
Корсаков И.Н.<sup>2</sup>, Паклина О.В.<sup>3</sup>, Деев Р.В.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

<sup>3</sup> ГКБ им. С.П. Боткина

<sup>4</sup> ВГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
cd105@mail.ru

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**

Массивные травмы мышечной ткани приводят к необратимому патологическому состоянию — синдрому объемной потери мышечной ткани. Эффективных способов восстановления таких дефектов до сих пор не существует. Одним из перспективных направлений разработок в данной области является создание тканеинженерных конструкций. Основным компонентом тканеинженерной мышцы является каркас, который должен обладать биологическими свойствами, способствующими заселению его клетками и интеграции в реципиентные ткани. Самыми оптимальными свойствами и структурой обладает децеллюляризованная мышечная ткань. Описано множество протоколов получения матриц естественного происхождения, однако их сравнительная эффективность в равных условиях остается не изученной. В данной работе проведена сравнительная оценка эффективности отмывки мышечной ткани стандартного размера (10×10×5 мм) десятью наиболее часто используемыми по данным литературы протоколами. Дифференциальным морфологическим критерием эффективности децеллюляризации являлось отсутствие ядер и остатков мышечных волокон при гистологическом исследовании микропрепаратов. Полученные результаты свидетельствовали о различной эффективности протоколов в удалении клеток и различной степени нарушения нативной структуры внеклеточного матрикса. На основе полученных данных нами был отработан оптимальный протокол децеллюляризации — обработка мышечной ткани 1% раствором додецилсульфата натрия в течение 72 ч. с последующей инкубацией в тритоне X-100 в течение 2 ч. Такой метод позволял достичь полного удаления ядерного материала и мышечных волокон, не оказывая при этом влияния на внеклеточный матрикс. Полученные данные свидетельствуют, что на матриксах толщиной более 1–2 мм при агитационном методе децеллюляризации единственным эффективным детергентом является додецилсульфат натрия. Использование такого протокола позволяет получать внеклеточные матриксы, пригодные для создания образцов тканеинженерной мышечной ткани.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).*

**Еремин И.И.<sup>1</sup>, Васильев В.С.<sup>2</sup>, Зорин В.Л.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ООО «Селлтера Фарм»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>3</sup> ПАО «Институт стволовых клеток человека»  
ieremin@cellthera.ru

### **ЖИРОВАЯ ТКАНЬ — ИСТОЧНИК КЛЕТОК С РЕГЕНЕРАТИВНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ**

На сегодняшний момент жировая ткань активно используется в медицине. Перемещение жировой ткани из одной области в другую (липофилинг, липотрансфер, липографтинг), по данным Американской ассоциации пластических хирургов, в 2016 г. являлось самой популярной процедурой в эстетической медицине. Жировая ткань на 50% состоит из стромы, в том числе из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Присутствие ММСК в липоаспирате было открыто еще в 2001 г. P. Zuket al., после чего жировая ткань стала рассматриваться как наиболее удобный источник аутологичных ММСК для клинического применения. Процесс получения ММСК включал выделение стромально-васкулярной фракции (СВФ) с последующим культивированием ядросодержащих клеток на питательной среде. СВФ это комплекс клеточных популяций, включающий в себя ММСК, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перициты, фибробласты, тканевые макрофаги и лейкоциты. В пластической хирургии клиническое применение СВФ первоначально было связано с попыткой улучшить приживление жирового трансплантата при липофилинге. Теоретическое обоснование обогащению жировой ткани аутологичными клетками (cell-assisted lipotransfer — CAL) было сформулировано K. Yoshimura et al. На животной модели авторы показали, что СВФ играет важную роль в процессе приживления жирового трансплантата, отвечая за неоангиогенез и формирование новой ткани. Было подсчитано, что липоаспират содержит в 2 раза меньше ядросодержащих клеток в сравнении с интактным жиром. Восстановление естественной концентрации клеток в трансплантате улучшало приживление жировой ткани в сравнении с небогащенным липоаспиратом, что было подтверждено в эксперименте и клинических наблюдениях. Однако, возможности использования СВФ в клинической практике значительно шире. Это связано с реализацией терапевтических эффектов, оказываемых различными клеточными популяциями СВФ при введении в ткань: синтез факторов роста, цитокинов, элементов внеклеточного матрикса, что обуславливает стимуляцию неоангиогенеза, модуляцию иммунного ответа и воспаления, поддержание жизнеспособности дифференцированных клеток в патологическом очаге, ремоделирование патологически измененных тканей, индукцию дифференцировки в специализированные клетки мезенхимального происхождения. Благодаря реализации этих универсальных эффектов СВФ может применяться практически во всех сферах медицины (травматология, урология, гинекология, кардиология, эндокринология, неврология и др.) и использоваться как локально, так и системно. В настоящее время ведутся исследования в отношении регенерации костной, хрящевой, мышечной, нервной ткани при помощи СВФ, которая является одним из наиболее часто используемых инструментов регенеративной меди-

цины. Также исследуется возможность использования СВФ в лечении острой реакции «трансплантат против хозяина», хронической аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, ревматоидного артрита, болезни Крона и других заболеваний.

**Карамова А.Э.<sup>1</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>2</sup>,  
Альбанова В.И.<sup>1</sup>, Нефедова М.А.<sup>1</sup>,  
Мончаковская Е.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Государственный научный центр  
дерматовенерологии и косметологии»  
Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова» РАН  
karamova@cnikvi.ru

### **ВРОЖДЕННЫЙ БУЛЛЕЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ. ДИАГНОСТИКА. ТЕРАПИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ**

**ВВЕДЕНИЕ.** врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это группа генодерматозов, обусловленная мутациями в генах структурных белков дермо-эпидермального соединения, которые приводят к образованию пузырей и/или эрозий в ответ на незначительную механическую травму. Выделяют 4 основных типа и 31 клинический подтип ВБЭ. Тяжелые подтипы заболевания характеризуются наличием длительно не заживающих эрозий и язв, которые могут сохраняться на коже от 1 месяца до нескольких лет.

**ЦЕЛЬ.** Оценить безопасность и эффективность терапии методом внутрикожного введения 21 до 50 лет (4 мужчин и 11 женщин): 5 больных с пограничным буллезным эпидермолизом (ПогрБЭ) и 10 больных с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом. Всем больным диагноз установлен клинически и подтвержден методом иммунофлюоресцентного антигенного картирования (ИАК). У всех больных были выбраны длительно незаживающие эрозии для введения препарата аллогенных фибробластов в концентрациях  $5 \times 10^6$  кл/мл,  $10 \times 10^6$  кл/мл и  $20 \times 10^6$  кл/мл. В аналогичные эрозии проводились инъекции с раствором 2% альбумина или 0,9% раствора физиологического раствора. Оценка эффективности терапии проводилась через 2 нед. после проведенного лечения, изменения экспрессии структурных белков дермо-эпидермального соединения проводилось методом ИАК.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** После введения  $5 \times 10^6$  кл/мл препарата фибробластов 4 больным с РДБЭ у больных с первоначальными размерами эрозий  $2 \times 3$  см (у трех больных) и  $3 \times 4$  см через 14 дней наблюдалась полная эпителизация дефектов. У больной с размером эрозии  $2 \times 2$  см через 14 дней наблюдалось незначительное уменьшение размера эрозии. 1 больной РДБЭ проведено лечение в разных концентрациях  $10 \times 10^6$  кл/мл и  $20 \times 10^6$  кл/мл на основе альбумина и  $20 \times 10^6$  кл/мл на основе физиологического раствора. Через 14 дней после введения  $10 \times 10^6$  кл/мл на основе физиологического раствора наблюдалась полная эпителизация эрозии, а после введения  $10 \times 10^6$  кл/мл и  $20 \times 10^6$  кл/мл на основе физ. раствора наблюдалось незначительное уменьшение размеров эрозий. 2 больным РДБЭ с эрозиями, схожими по размеру, ( $3 \times 4$  см и  $3 \times 5$  см) проведены инъекции фибробластов в концентрации  $20 \times 10^6$  кл/мл. Через 14 дней у обоих больных наблюдалось сокращение площади эрозий более, чем в 2 раза. После 2-крат-

ного введения  $20$  млн кл/мл фибробластов наблюдалось незначительное сокращение размеров эрозии. В результатах ИАК после введения различных концентраций фибробластов и контрольных препаратов более выраженное повышение экспрессии отмечалось после введения фибробластов в концентрации  $20 \times 10^6$  кл/мл.

**ВЫВОДЫ.** Полученные данные указывают на то, что метод внутрикожного введения фибробластов может являться эффективным и безопасным в лечении длительно незаживающих эрозий при пограничном и дистрофическом врожденном буллезном эпидермолизе.

**Еремичев Р.Ю.<sup>1</sup>, Макаревич О.А.<sup>1</sup>,  
Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>, Александрушкина Н.А.<sup>1</sup>,  
Макаревич П.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины  
МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
romaneremichev@gmail.com

### **ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ IN VITRO**

Слизистая оболочка матки (эндометрий) женщины репродуктивного возраста обладает уникальной для человека способностью к ранозаживлению путем регенерации во время менструации [1]. Для осуществления данного процесса сохранившимся клеткам необходимо заместить часть утраченных таким образом, чтобы полностью восстановить нормальную структуру эндометрия. Во время менструации они подвергаются воздействию различных стимулов, в том числе паракринных. Известно, что менструальная кровь отличается по составу от периферической и может быть определена как отделяемое из раны [2]. Мы предположили, что в менструальной крови содержатся уникальные растворимые факторы, необходимые для регенерации эндометрия после повреждения в ходе менструации. Для проверки данной гипотезы мы выделили мезенхимные стромальные клетки эндометрия (эМСК) центрифугированием менструальной крови на 15% йодиксаноле при 500 g в течение 40 мин. Полученные эМСК культивировали в среде DMEM/F-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в стандартных условиях ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). На 4 пассаже был определен иммунофенотип клеток: CD73+, CD90+, CD105+, CD146+/-, CD45-, CD14-, CD20-, CD34-, HLA-DRII-. На 7 пассаже от того же донора одновременно получали сыворотку периферической крови (СПК) и сыворотку менструальной крови (СМК). После разведения образцов DMEM/F12 и выравнивания концентрации белка объемная доля СПК и СМК в полученных средах составила 10% и 9,3% соответственно. В течение 5 сут. эМСК культивировали с добавлением СМК, СПК или ФБС. Оценку морфологии клеток осуществляли с использованием системы прижизненной съемки Incucyte ZOOM. При культивировании эМСК с ФБС или СПК клетки были более распластанными, имели неровные края и зернистость цитоплазмы вокруг ядра. При культивировании с СМК в первые 72 ч. клетки приобретали веретенообразную форму, с вытянутыми заостренными концами и более ровными краями. Зернистость цитоплазмы вокруг ядра практически

отсутствовала. После 72 ч. культивирования, по достижении 100% конfluenceности клетки теряли веретенообразную форму, становясь полигонально-звездчатыми. Края оставались ровными. Значительная часть клеток уменьшалась в размере. Полученные данные позволяют утверждать, что в СМК содержатся уникальные растворимые факторы, изменяющие морфологию ЭМСК. Возможно, феномен, полученный нами *in vitro*, отражает события, происходящие *in vivo* при ранозаживлении эндометрия путем регенерации во время менструации.

#### Литература:

1. Maybin, J.A. and H.O.D. Critchley, Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update*, 2015. 21(6): p. 748-61.

2. van der Molen, R.G., et al., Menstrual blood closely resembles the uterine immune micro-environment and is clearly distinct from peripheral blood. *Hum Reprod*, 2014. 29(2): p. 303-14.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках госзадания МГУ и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Чаленко Я.М., Собянин К.А.,  
Сысолятины Е.В., Лаврикова А.Я.,  
Ермолаева С.А.**

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
dremolaeva@mail.ru

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТОЗЕ**

Острый гепатоз (острая токсическая дистрофия печени) чаще всего является следствием тяжелых токсических отравлений, в том числе, алкоголем. Начало заболевания сопровождается увеличением печени и нарушением ее функций, при прогрессировании болезни происходит развитие тяжелой печеночной недостаточности. В тяжелых случаях возможен летальный исход, а в более легких случаях заболевание переходит в хроническую форму. Регенерация печени при остром гепатозе координируется набором факторов роста, среди которых центральную роль играет фактор роста гепатоцитов (HGF). Рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR) контролирует пролиферацию и подвижность гепатоцитов, а также клеток эндотелия и ряда эпителиальных клеток. Терапевтическое использование рекомбинантного HGF затруднено вследствие необходимости посттрансляционной модификации белка и малой биодоступности. Фактор инвазии бактерии *Listeria monocytogenes* InIB специфически связывается с HGFR через LRR-домен, приводя к активации рецептора. Целью работы была оценка возможности использования InIB для регенерации печени при экспериментальном остром гепатозе. Мышам линии BALB/c интрагастрально был введен 50% раствор CCl<sub>4</sub> в оливковом масле (4,5 мл/кг). HGFR-связывающий домен InIB был клонирован из клинического штамма *L. monocytogenes*. Очищенный препарат белка, обозначенного InIB321/15, введен внутривенно на 4-й и 7-й день в дозе 1 мг/кг. Биохимические, морфологические и гистологические параметры печени изучены на 7, 11, 15, 18 и 21 дни. В качестве контроля использовали

рекомбинатный HGF. По сравнению с контрольными животными, не получающими лечения, у животных, получавших InIB 321/15 и HGF, наблюдалось уменьшение массы печени и восстановление биохимических показателей, начиная с 7-х сут. Уровень аланинаминотрансферазы (ALT) у мышей, получивших препарат InIB 321/15, достиг нормы на 15-й день, в то время как у мышей, получавших препарат HGF — на 18-й. Гистологические данные находились в соответствии с морфологическими и биохимическими показателями. *In vitro* анализ эффекта InIB 321/15 на клетки HepG-2 и HUVEC показал, что InIB 321/15 в концентрации 7 мкМ стимулирует автофосфорилирование HGFR и активность нижележащих путей: в частности, наблюдалось фосфорилирование Erk1/2 киназы. Митогенная активность InIB 321/15 была показана на указанных клетках по увеличению митотического индекса (19,6 и 5,8, соответственно), что превышало показатели, полученные для HGF (13,6 и 3,6, соответственно). Обработка InIB 321/15 приводила к перестройкам цитоскелета и увеличению подвижности клеток. В целом, полученные результаты показывают, что бактериальный агонист HGFR, белок InIB 321/15, стимулирует регенерацию печени при остром гепатозе, воздействуя на сигнальные пути, контролируемые рецептором HGFR.

Финансирование исследования: *РНФ № 16-15-00091.*

**Жидкова О.В., Ездакова М.И.**

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН  
flain-fish@yandex.ru

#### **ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАК АКТИВАТОР МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) рассматривают как перспективный инструмент терапии воспалительных заболеваний и травм, благодаря их способности дифференцироваться в различные клеточные типы, длительному культивированию *in vitro* и наличию иммуномодулирующих свойств. При системном введении МСК до сих пор не удалось достичь значительного уровня их сайт-специфической миграции. Предполагается, что механизмы миграции МСК в область повреждения подобны таковым у лейкоцитов. Вероятно, эндотелиальные клетки (ЭК) могут влиять на подвижность МСК и способность к миграции. Провоспалительные цитокины, синтезируемые иммунными клетками в области повреждения, приводят к активации эндотелия. Активированный эндотелий обладает высокой паракринной активностью и синтезирует цитокины с плейотропным действием ИЛ-6 и ИЛ-8. Целью данной работы являлось изучение паракринного влияния эндотелиальных клеток на подвижность МСК. МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани здоровых доноров и культивировали в стандартных условиях. Эндотелиальные клетки (ЭК) получали из пупочной вены и также культивировали при стандартных условиях. Для получения кондиционированной среды (КС) ЭК активировали ФНО-альфа (10 нг/мл), через сутки среду заменяли на свежую, инкубировали 24 ч., затем КС собирали и хранили при -30°C. Способность к ненаправленной миграции МСК определяли в модели «рана». Для этого на монослой МСК

наносили механическое повреждение — «рану», при этом культуральную среду заменяли на КС. «Рану» фотографировали сразу после нанесения и через 24 ч. Площадь миграции подсчитывали с использованием программного обеспечения NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Германия). Направленную миграцию оценивали в модифицированной камере Бойдена. Для этого 20 тыс. клеток (МСК) добавляли в трансвелл и помещали его в лунку 24-луночного планшета, содержащего КС от ЭК. Клетки, мигрировавшие через мембрану за 24 ч, фиксировали и окрашивали йодидом пропидия, фотографировали и подсчитывали их количество в 5 полях зрения с использованием программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, США). Концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Perotecth, Великобритания) согласно инструкции производителя. Активация приводила к возрастанию уровня ИЛ-6 в 2.4 раза, а ИЛ-8 в 30.8 в КС от ЭК. КС от ЭК стимулировала направленную и ненаправленную миграцию МСК. Причем КС от активированных ЭК вызывала достоверное увеличение площади миграции МСК, однако не оказывала такого эффекта на направленную миграцию МСК. Таким образом, ЭК были способны паракринно активировать подвижность МСК, что выражалось в увеличении площади миграции в модели «рана» и возрастании направленной миграции. Вероятно, секреция ИЛ-6 и ИЛ-8 клетками сосудистого эндотелия играет роль в процессах миграции МСК в область повреждения.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-10407.*

**Жлоба А.А.<sup>1</sup>, Субботина Т.Ф.<sup>1</sup>, Смолина Н.А.<sup>2</sup>, Худяков А.А.<sup>2</sup>, Костарева А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова*

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова*  
zhlobaaa@1spb.gmu.ru

#### **ОЦЕНКА МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПО ДИНАМИКЕ МЕТАБОЛИТОВ АРГИНИНА**

Мониторинг развития клеточных культур требует информативных маркеров состояния метаболизма клеток. Потребление аминокислот культурами растущих и дифференцирующихся клеток используется в технологиях по производству рекомбинантных белков, при подготовке стволовых клеток к трансплантации, при разработке протоколов для новых видов клеточных культур, при создании новых питательных сред. Аминокислотный состав сред всегда предусматривает большие избытки аминокислот, что затрудняет точную оценку их небольшой убыли. Мы предлагаем определять в культивационных средах образующиеся производные аргинина, в том числе, гомоаргинин (гАрг) или орнитин. В организме человека и животных гАрг образуется преимущественно в ходе реакции, катализируемой аргинин: глицинамидинотрансферазой (AGAT, EC 2.1.4.1). В задачи настоящего исследования входило изучение динамики образования гАрг и орнитина в ходе дифференцировки С2С12 миобластов в сравнении с динамикой потребляемых и образующихся аминокислот. Миогенную дифференцировку клеток производили согласно Keige P., с соавторами, 2013, с получением образцов культуральной среды на дни 0 (индукция),

2, 4, 7, 9 и 11 дифференцировки. В этих образцах определяли содержание аминокислот и их производных с помощью ВЭЖХ-анализа. Иммуноцитохимическое исследование позволило провести морфологический контроль процесса. Содержание гАрг, орнитина и цитруллина в ходе развития клеточной культуры имели схожую динамику с максимумом, соответствующим второму дню дифференцировки ( $r = 0.53$ ;  $p = 0.008$ ). Изменение содержания гАрг в среде выявляется с большей достоверностью, нежели орнитина или любых исходных аминокислот в составе сред. Темп накопления гАрг не коррелирует с интенсивностью потребления Арг, Лиз, Гли. Из незаменимых аминокислот интенсивнее всех потребляются аминокислоты с разветвленной цепью — Вал, Лей, Иле до 7-го дня дифференцировки, далее наблюдается их высвобождение в среду. Динамика аминокислот, участвующих в энергетическом метаболизме, выглядит иначе. Высокая исходная концентрация Глн падает примерно в 2 раза после каждого обновления среды до 11 дня дифференцировки. Аланин же, присутствующий в среде в минимальных количествах, постоянно высвобождается в высоких концентрациях на протяжении всего эксперимента. Обнаруженная корреляция между уровнями гАрг и орнитина, но не цитруллина, объясняется тем, что оба первых могут возникать в одной и той же реакции, катализируемой AGAT, которая необходима для биосинтеза креатина. Таким образом, оценку становления окислительного энергетического метаболизма миоцитов без взятия клеточного материала на постмитотической, то есть ранней стадии дифференцировки, следует проводить по образованию гАрг и/или орнитина, а не по уровню потребления аминокислот.

Финансирование исследования: *Фонд РФФИ, грант № НК 15-04-02480\15.*

**Журавлева З.Н.**

*ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН*  
zhuravleva@iteb.ru

#### **ЭЛЕКТРОНМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТАНОВЛЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ МЕЖДУ НЕЙРОТРАНСПЛАНТОМ И МОЗГОМ**

В основе регенерации поврежденной центральной нервной системы с помощью нейротрансплантации лежит формирование функциональных синаптических связей между трансплантированными клетками и мозгом реципиента. Известно, что при этом связи устанавливаются как с типичными, так и с атипичными нейрональными мишенями. Целью исследования было выявление ультраструктурных адаптивных преобразований в пре- и постсинаптических компартментах aberrантных синаптических контактов. Работа проведена на гетеротопических аллотрансплантатах зубчатой фасции гиппокамповой формации, развивающихся в соматосенсорной области неокортекса взрослых крыс в течение 5 мес. В качестве донорской ткани использовали закладки зубчатой фасции от 19–20-дневных плодов. Электронномикроскопическое изучение показало, что синапсы, сформированные трансплантированными нейронами на чужеродных мишенях, воспроизводили свои детерминантные признаки: гигантские размеры аксональной терминали и два типа функциональных взаимодействий — синаптические контакты



с дендритными шипиками и адгезионные соединения с поверхностью дендритов. В то же время были обнаружены важные изменения в структуре эктопических синапсов. Врастающие из трансплантата аксоны индуцировали в постсинаптических локусах чужеродных нейронов формирование разветвленных дендритных шипиков, которые несвойственны нервным клеткам неокортекса в норме. В местах отращения шипиков от дендритов наблюдались признаки усиленного синтеза метаболитов, свидетельствующие о локальной нейробиохимической реорганизации дендритного древа. Сравнительный количественный и морфометрический анализ гигантских синаптических окончаний аксонов гранулярных нейронов зубчатой фасции, сформированных в неокортексе после трансплантации и расположенных в гиппокампе *in situ*, показал, что в эктопических синапсах значительно увеличена протяженность адгезивных соединений терминали с дендритом. Кроме того, в таких синапсах обнаружено увеличение числа гранул, содержащих нейропептидные котрансммиттеры, и перераспределение их из синаптоплазмы к активным зонам. Таким образом, при формировании синаптических связей между трансплантированными нейронами и мозгом происходит активация адгезионных и нейропептидных сигнальных механизмов, что приводит к синтезу новых рецепторов и развитию новых, типичных для донорской структуры, разветвленных дендритных шипиков на дендритах нейронов мозга реципиента. Результаты показали, что в процессе функциональной интеграции нейротрансплантатов с мозгом ведущая регуляторная роль принадлежит прорастающим аксонам клеток донорской ткани.

Финансирование исследования: *Бюджет и грант РФФИ (проект № 17-04-00786)*.

**Журбина Н.Н., Курилова У.Е., Герасименко А.Ю.**

Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники»  
Natalia93Zhurbina@gmail.com

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ТРЕХМЕРНЫХ НАНОКОМПОЗИТНЫХ БИОКОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Разработана технология получения биосовместимых нанокompозитных биоконструкций на основе белковой матрицы, импрегнированной каркасом углеродных нанотрубок, предназначенных для восстановления дефектов в области костно-хрящевых соединений путем стимуляции роста клеток биологической ткани. Технология предусматривает получение нанокompозитной дисперсии углеродных нанотрубок и белковой составляющей (альбумин или коллаген) в воде, с последующим послойным лазерным спеканием дисперсии. Лазерное спекание осуществлялось на установке, включающей в себя трехкоординатный моторизированный столик, оптическую систему и ИК диодный лазер (970 нм). Кроме того, установка обладала системой контроля температуры в диапазоне от 20 до 90°C с точностью измерения  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  для предотвращения термических повреждений структуры нанокompозитных биоконструкций. Были изготовлены экспериментальные образцы нанокompозитных биоконструкций и проведены исследования их биологических свойств *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* исследования жизненного

цикла клеток остеобластов при их инкубации на поверхности нанокompозитных биоконструкций были проведены с использованием метода МТТ-теста и атомно-силовой микроскопии. В процессе инкубации клеток наблюдался процесс адгезии клеток к образцам. Были обнаружены клетки в стадии деления. Наблюдался активный рост клеток в течение времени инкубации. Выживаемость клеток, инкубированных в течение 3 сут. на поверхности нанокompозитных биоконструкций, составляла от 45 до 65%. Также были проведены исследования биохимических и гематологических параметров крови лабораторных животных при подкожной имплантации образцов. Гемолитическая активность нанокompозитных биоконструкций составила не более 1,2% при максимально допустимом значении 20%. Исследования систем и органов организма, ответственных за метаболизм, показали отсутствие статистически значимых отклонений между экспериментальной и контрольной группами животных. *In vivo* исследования нанокompозитных биоконструкций были проведены с использованием лабораторных животных — кроликов. В процессе исследования происходило заполнение костного канала, сформированного в левой берцовой кости животного, нанокompозитной дисперсией, и ее дальнейшая обработка лазерным излучением до образования твердой нанокompозитной биоконструкции. Животные наблюдались в течение 8 нед., после чего были проведены гистологические исследования области имплантации, показавшие наличие выраженной пролиферации незрелой клеточной фиброзной ткани с участками костеобразования и мелкоочаговым обызвествлением. Данные исследования подтвердили возможность использования нанокompозитных биоконструкций для восстановления дефектов костно-хрящевых соединений.

Финансирование исследования: *Работа была выполнена при содействии Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение 14.578.21.0221 RFMEF157816X0221)*.

**Загайнова Е.В.<sup>1</sup>, Мелешина А.В.<sup>1</sup>, Быстрова А.С.<sup>1</sup>, Дуденкова В.В.<sup>1</sup>, Сироткина М.А.<sup>1</sup>, Роговая О.С.<sup>2</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова  
ezagaynova@gmail.com

#### **ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК И КАЧЕСТВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ БЕЗ МАРКЕРОВ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА**

Развитие клеточных технологий и разработка множества тканеинженерных конструктов на этапе доклинического исследования и для оценки качества перед трансплантацией пациенту требуют создания новых безопасных и высокоинформативных технологий. Основными требованиями к таким методам оценки являются — с одной стороны высокая информативность и достоверность (на весах качества жизни пациента), с другой стороны — отсутствие дополнительных контрастов и повреждающих воздействий. Для поставленных задач возможно применение современных оптических технологий. Для оценки степени дифференцировки мезенхимных стволовых клеток был разработан специальный ме-

тод анализа на основе многофотонной микроскопии с временным разрешением, которая позволяет оценить уровень метаболизма живых клеток по автофлюоресценции кофакторов (связанного и свободного НАДН, ФАД) и отследить раннюю реакцию клеток при дифференцировке в виде смены доминирующего метаболизма с гликолиза на ОКСФОС. Анализ динамики изменения метаболизма был выполнен при трех дифференцировках мезенхимных стволовых клеток — адипогенной, хондрогенной и остеогенной. Для каждой дифференцировки показаны характерные метаболические сдвиги. Полученные данные станут основой разработки нового способа сортировки без дополнительных маркеров клеточных продуктов (1, 2). Для оценки качества тканеинженерных конструкций, например дермальных эквивалентов, был предложен ряд технологий, позволяющий оценить готовность и качество трансплантата перед пересадкой. Дермальные эквиваленты, содержащие коллагеновый матрикс и клетки дермальной папиллы, оценивали в динамике по качеству структурирования матрикса и состоянию клеточной компоненты с использованием оптической когерентной томографии (ОКТ) и многофотонной микроскопии с генерацией второй гармоники. Оптические методы позволили объективно установить временные параметры контракции геля и формирования структурированного коллагена (по изменению степени поляризации — методом ОКТ и характеристик сигнала генерации второй гармоники). Оба метода не требуют дополнительных контрастов и не нарушают жизнеспособности эквивалента и могут объективно контролировать готовность эквивалента к пересадке. Для контроля качества новообразованной ткани после пересадки эквивалента реципиенту, прижизненно, без биопсии были предложены методы оптической и многофотонной томографии, которые позволяют оценить эпителизацию, формирование рубца, микроциркуляцию и клеточность регенерирующей раны. Возможно длительное динамическое наблюдение как экспериментальных животных при разработке новых эквивалентов, так и пациентов после трансплантации кожных эквивалентов.

#### Литература:

1. Meleshina AV, et al. Probing metabolic states of differentiating stem cells using two-photon FLIM. *Sci Rep.* 2016 Feb 25;6.
2. Meleshina AV, et al. Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation. *StemCellResTher.* 2017 Jan 28;8(1).

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке РФФ проекта 17-75-20178 и РФФИ проекта 15-29-04851.*

**Зайцева А.К., Худяков А.А., Карпушев А.В., Малашичева А.Б., Костарева А.А.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Санкт-Петербургский государственный университет  
zaytseva.anastasia.zak@gmail.com

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ СТИМУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ А В РАЗВИТИИ И ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА**

Поддержание баланса входящих и выходящих ионных токов в кардиомиоцитах — необходимое условие нормального функционирования сердца.

Мутации в генах, кодирующих ионные каналы, могут приводить к сдвигу равновесия ионных токов. Мутации в гене SCN5A, кодирующем кардиоспецифичный потенциал-зависимый натриевый канал Nav1.5, характеризуются уменьшением функциональной активности каналов и ассоциированы с синдромом Бругада, являющимся частой причиной внезапной смерти у пациентов со структурно нормальным сердцем. Падение натриевого тока также было показано при мутациях в генах, кодирующих белки, регулирующие активность и локализацию натриевых каналов. Таким геном, например, является ген плакофиллина-2 PKP2, мутации в котором ассоциированы с развитием аритмогенной кардиомиопатии (АКМП). Возможным механизмом коррекции нарушений баланса ионных токов при данных заболеваниях является фармакологическая регуляция величины натриевого тока. Одним из механизмов его увеличения является запуск сигнального пути протеинкиназы А путём активации адренорецепторов их агонистами (адреналин, норадреналин и т.д.), что приводит к фосфорилированию каналов Nav1.5 и усилению их транспорта на мембрану клетки. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния норадреналина на величину натриевого тока в клетках линии HEK293T, экспрессирующих SCN5A дикого типа или SCN5A, несущий мутацию F543L, ассоциированную с синдромом Бругада, и в кардиомиоцитах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК), полученных от пациента с АКМП с мутациями в гене PKP2 (с.354delT, p.Lys859Arg) и здорового донора. Для экспрессии SCN5A клетки линии HEK293T трансдуцировали лентивирусными частицами, несущими кодирующую последовательность гена SCN5A и гена флуоресцентного белка GFP. Линии иПСК получали путём репрограммирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. Для получения кардиомиоцитов иПСК адаптировали к безфидерным условиям и дифференцировали при помощи модуляции Wnt-сигналинга малыми молекулами. Регистрация натриевого тока осуществлялась методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении со всей клетки. Биофизические исследования на модели HEK293T показали значительное падение пиковой плотности тока при экспрессии мутантного SCN5A по сравнению с SCN5A дикого типа. Инкубация с норадреналином в течение 1–2 ч. приводила к увеличению плотности натриевого тока в 4,6 раз, в случае экспрессии SCN5A дикого типа, но не изменяла величину натриевого тока при экспрессии мутантного SCN5A, что может быть вызвано нарушением регуляции со стороны протеинкиназы А. Инкубация с норадреналином также увеличивала величину натриевого тока в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента с АКМП (в 7,2 раза) и от здорового донора (в 3,1 раза). Полученные данные позволяют рассматривать стимуляцию сигнального пути протеинкиназы А как перспективную терапевтическую стратегию заболеваний сердца, связанных с нарушениями потенциал-зависимого натриевого тока.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 14-15-00745-П.*

**Журавлева М.Н.<sup>1</sup>, Закирова Е.Ю.<sup>1</sup>,  
Валеева А.Н.<sup>2</sup>, Масгутова Г.А.<sup>1</sup>,  
Подковырина Ю.С.<sup>2</sup>, Якимкин А.Е.<sup>2</sup>,  
Ризванов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный  
Университет

<sup>2</sup> Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана  
lenahamzina@yandex.ru

### **ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ 3 СТЕПЕНИ**

Известно, что лечение дефектов кожи с помощью фибробластов, культивированных *in vitro*, получило широкое признание в мире. С целью усиления их регенеративных свойств нами были получены и протестированы на животных трансгенные фибробласты кролика с целевой вставкой гена основного фактора роста фибробластов человека FGF-2. Для этого нами были выделены фибробласты из кожи кролика методом эксплантации. В полученные фибробласты с помощью рекомбинантного лентивируса был доставлен ген FGF-2. Эффективность трансдукции составила 78%. У 6 кроликов были смоделированы термические ожоги 3 степени площадью 25 мм<sup>2</sup> по методике А. С. Аладышкина. Животные были поделены на 2 группы (контрольная и опытная). После иссечения струпа контрольной группе на место ожога наносили суспензию интактных аллогенных дермальных фибробластов в фибриновом клее Тиссукол в количестве 1 млн, а опытной группе — 1 млн аллогенных генномодифицированных фибробластов по той же методике. Для предупреждения инфицирования применяли антибиотик — 5% раствор байтрила в дозе 0,5 мл, инъекцию делали подкожно в область холки в течение 5 дней. Первые очаги эпителизации появились в обеих группах на 3 день после нанесения фибробластов на рану. Окончательное заживление и образование рубца в контрольной группе было отмечено на 25 день после нанесения фибробластов, в опытной — на 22 день. Согласно гистологическому исследованию образцов кожи, взятых у кроликов на 30 день после нанесения клеточного препарата, у кроликов контрольной группы эпидермис тонкий, прерывистый. Под эпидермисом расположена хорошо развитая рыхлая грануляционная соединительная ткань с большим количеством клеток и волокон, под ней наблюдаются участки дермы с волосяными фолликулами и сальными железами. На препарате виден результат контракционного натяжения. В образцах кожи у кроликов опытной группы эпидермис плотный, состоит из нескольких четко визуализируемых слоев клеток, с хорошим ороговением. Под эпидермисом наблюдаются участки хорошо развитой грануляционной соединительной ткани на поздней стадии репарации, с большим количеством клеток, сальными железами и волосяными фолликулами. Таким образом, несмотря на практически одновременную эпителизацию ран у кроликов в опытной и контрольной группах, гистологическое исследование показало более полное восстановление эпителия у кроликов опытной группы по сравнению с контрольной за одинаковый промежуток времени. Следовательно, применение генномодифицированных дермальных фибробластов стимулирует процессы регенерации при эпителизации ожоговых ран.

**Захарова И.С.<sup>1,2,3</sup>, Смирнова А.М.<sup>1,2,4</sup>,  
Живень М.К.<sup>1,2,3</sup>, Шевченко А.И.<sup>1,2,3,4</sup>,  
Григорьева Е.В.<sup>1,2,3,4</sup>, Елисафенко Е.А.<sup>1,2,3</sup>,  
Закиян С.М.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>3</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет  
zakharova@bionet.nsc.ru

### **ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ- МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЛИНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ HIF-ФАКТОР, ИНДУЦИРУЕМЫЙ ГИПОКСИЕЙ**

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека обычно культивируют при атмосферной концентрации кислорода, в то время как развитие ранних эмбрионов, из которых получают ПСК, происходит в гипоксических условиях при концентрации кислорода 3–5%. Культивируемые ПСК человека значительно отличаются по профилю экспрессии генов от клеток внутренней клеточной массы раннего эмбриона. Предполагают, что определенный вклад в различия между клетками внутренней клеточной массы и получаемыми из них ПСК могут вносить условия культивирования, в частности, концентрация кислорода в среде. Во всех типах клеток ответ на гипоксию опосредуется транскрипционным фактором HIF (Hypoxia-inducible factor). Активируемые HIF сигнальные каскады вовлечены в процессы развития, метаболизма, реакции воспаления и ряд других физиологических процессов, в том числе играют ключевую роль в регуляции ангиогенеза. В настоящее время модуляция HIF-пути является перспективной терапевтической стратегией для управления различными заболеваниями. Целью данной работы является получение генетически-модифицированной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека со стабильной экспрессией HIF-2 $\alpha$  в нормоксических условиях, реализованной посредством сайленсинга его ингибитора INT6/eIF3 с использованием системы CRISPR/Cas9. Чтобы произвести сайленсинг INT6/eIF3, последовательности направляющих РНК подобраны таким образом, чтобы получалась делеция участка гена размером 200 п.н., включающая точку старта транскрипции и начало первого экзона INT6/eIF3. Полученные генетические конструкции доставлены в ИПСК человека линии iMA-1L с помощью нуклеофекции. Наличие требуемой делеции в полученных субклонах ИПСК подтверждено секвенированием. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени, уровень экспрессии INT6/eIF3 в генетически-модифицированных субклонах достоверно снижен более чем в 3 раза. При этом уровень экспрессии HIF-2 $\alpha$  достоверно повышен по сравнению с контрольной линией ИПСК. Полученные генетически-модифицированные ИПСК будут использованы для исследования влияния активации HIF-2 $\alpha$  в нормоксических условиях на ангиогенные свойства их эндотелиальных производных. Результаты данного исследования внесут значительный вклад в понимание фундаментальных молекулярных механизмов HIF-зависимого ангиогенеза, расширят представления

о сигнальных каскадах, запускаемых при целевой активации NIF, что необходимо для разработки перспективных терапевтических стратегий управления различными заболеваниями, такими как ишемические поражения любой этиологии и онкология.

Финансирование исследования: *Работа по созданию генетических конструкций и их доставка в клетки поддержана грантом РФФ № 16-15-10128, работа по анализу генетически-модифицированных субклонов поддержана грантом РФФ № 17-75-10047.*

**Захватов А.Н., Тарасова Т.В., Захаркин И.А., Захватова Ю.А.**

ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»,  
Медицинский институт  
zachvatan78@mail.ru

### **КОРРЕКЦИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ КОЛЛАГЕНА ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Травма сустава приводит к развитию воспаления и активации деструктивных процессов хрящевой ткани. В результате развивается дисфункция синтетических процессов хондроцитов, проявляющаяся образованием структурно неполноценного короткоцепочечного фибриллярного коллагена, что препятствует нормальной репарации хрящевой ткани.

**ЦЕЛЬ.** Оценить интенсивность деструктивных и регенеративных процессов коллагена при посттравматическом артрите в эксперименте на фоне внутрисуставной антиоксидантной терапии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проведены на 72 белых нелинейных крысах, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением правил обращения с животными. Животные были разделены на 3 серии. Первую серию составили интактные крысы ( $n = 12$ ). В контрольной ( $n = 30$ ) и опытной ( $n = 30$ ) серии под комбинированной анестезией моделировали повреждение коленного сустава механическим путём в модификации Г.М. Дубровина (2005). Во II контрольной серии лечение не проводилось. На животных III серии изучалась эффективность внутрисуставной антиоксидантной терапии этоксиололом в дозе 5 мг/кг через день в количестве 5 инъекций. На данную методику получен патент на изобретение № 2516951 от 26.03.14 г. Оценку обмена коллагена проводили по содержанию свободного (СО), пептидносвязанного (ПСО) и белковосвязанного (БСО) оксипролина в сыворотке крови по методу П.Н. Шараева. На методику оценки интенсивности деструктивных и синтетических процессов коллагена при посттравматическом артрите получен патент на изобретение № 2463000 от 10.10.2012 г. Животных выводили из эксперимента на 28 сутки наблюдения. Статистическая обработка результатов исследований проведена с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения считали достоверными при  $p$  меньше 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** При моделировании травматического повреждения сустава в контрольной серии наблюдался дисбаланс метаболизма коллагена, характеризующийся повышением уровня СО в 2 раза ( $p < 0,001$ ), и значительным ростом ПСО в 5,3 ( $p < 0,001$ ) раза относительно животных интактной серии, свидетельствующих о интенсивной деструкции соединительной ткани. Наблюдалось повышение коэффициента ПСО/СО на 155,5% над

должными значениями. На фоне продолжающихся деструктивных процессов коллагена происходил резкий рост БСО в 2,42 ( $p < 0,001$ ), определяющего высокую активность фибриллогенеза, приводя к избыточному накоплению соединительной ткани с развитием склерозирования хряща и субхондральной кости. При лечении этоксиололом фракции оксипролина в сыворотке крови по сравнению с данными контрольной серии изменились следующим образом: СО снизился на 50,19% ( $p < 0,001$ ), ПСО – на 79,19% ( $p < 0,001$ ), БСО – на 54,70% ( $p < 0,001$ ), ПСО/СО – на 60,14% ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, антиоксидантная терапия оказывала значительное корригирующее влияние на деструктивные и синтетические процессы коллагена, определяемые снижением уровня всех фракций оксипролина, что отражает подавление процессов деструкции и избыточной пролиферации соединительной ткани в пораженном суставе.

**Золотаренко А.Д., Брускин С.А.**

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН  
zalenkainbox@gmail.com

### **ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР FRA1 ПРИВОДИТ К АМПЛИФИКАЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ И ОБРАЗОВАНИЮ БЛЯШЕК ПРИ ПСОРИАЗЕ**

Нарушения пролиферации и дифференцировки структурных клеток кожи, кератиноцитов, играют важную роль в патогенезе различных заболеваний – опухолей, воспалительных заболеваний кожи, в нарушении заживления ран и общих барьерных функций кожи. Согласно общепринятой на сегодняшний день концепции, псориаз является хроническим иммуноопосредованным воспалительным заболеванием и вызывается избыточной активацией иммунных клеток – Т клеток 1 и 17 типов, дендритных клеток кожи и нейтрофилов. Однако основную роль в образовании псориазных бляшек на коже больных играют именно кератиноциты. Под воздействием цитокинового шторма в очаге воспаления данные клетки начинают активно пролиферировать, а их дифференцировка при этом нарушается. Кроме того, они начинают продуцировать большое количество цитокинов и хемокинов, еще сильнее амплифицируя воспаление. Все это приводит к возникновению характерных повреждений на коже больных. Целью данного исследования стала оценка роли транскрипционного фактора FRA1, члена суперсемейства AP1, в развитии воспаления и образовании псориазных бляшек. Ранее в ходе полногеномного анализа транскриптома кожи больных псориазом были получены данные об участии данного транскрипционного фактора в регуляции сигнальных каскадов, активированных в коже больных. Для оценки вклада FRA1 в развитие псориазных повреждений была создана линия кератиноцитов с индуцибельной сверхэкспрессией данного гена. Полученные клетки характеризовались более активной пролиферацией и миграцией, чем клетки дикого типа, и изменением фенотипа с эпителиального на мезенхимально-подобный, что подчеркивает сходство псориазического воспаления с процессом заживления ран. Была проведена оценка экспрессии генов-мишеней данного транскрипционного фактора, выявленных в ходе анализа транскриптома при псориазе. Исследование показало, что под воздействием FRA1 наблюдается повышенный синтез ключевых для псориаза провос-

палительных цитокинов и хемокинов, например, TNF $\alpha$  и CXCL8, а также и изменения в профилях маркеров дифференцировки кератиноцитов. Зимографический анализ показал повышенную секрецию матриксных металлопротеаз в полученной клеточной линии, что может приводить к более активному ремоделированию внеклеточного матрикса, усилению способности клеток к миграции и снижению полярности клеток. Кроме того, данный класс ферментов осуществляет процессинг некоторых провоспалительных цитокинов, приводя к их созреванию в активные формы. Таким образом, кератиноциты со сверхэкспрессией FRA1 имели характеристики, сходные с теми, которые наблюдаются в очагах псориазического воспаления в коже больных. Проведенные эксперименты подтверждают гипотезу о том, что псориаз-ассоциированные сверхэкспрессия и повышенная активность транскрипционного фактора FRA1 в кератиноцитах приводят к амплификации воспаления, а также связаны с развитием псориазических повреждений на коже больных. Показано, что трофические факторы, продуцируемые кератиноцитами со сверхэкспрессией данного транскрипционного фактора, приводят к увеличению пролиферации и миграции соседних клеток, что вместе с активным ремоделированием внеклеточного матрикса может приводить к утолщению эпидермиса и образованию псориазических бляшек.

**Зорин В.Л.<sup>1</sup>, Зорина А.И.<sup>1</sup>, Копнин П.Б.<sup>2</sup>, Осипов А.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Институт стволовых клеток человека

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

<sup>3</sup> Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. Бурназяна ФМБА России  
zorin@hsci.ru

### **ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ТИПОМ КОЛОНИЙ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ И КЛЕТОЧНЫМ СТАРЕНИЕМ**

С помощью метода избирательного клонирования нами изучена взаимосвязь между долей стареющих клеток в первичных культурах фибробластов кожи (полученных из биоптатов кожи от 10 здоровых доноров в возрасте 33–54 лет) и типами колоний, образованных клетками-предшественниками фибробластов. В культуре стромальных клеток кожи человека клетки-предшественники фибробластов, в зависимости от их пролиферативной активности, образуют три типа колоний: плотные, состоящие из сотен и тысяч фибробластов (что свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале образующих их клеток); диффузные, состоящие из 50–100 клеток (что свидетельствует о невысокой способности к пролиферации образующих их клеток-предшественников фибробластов) и смешанные. Используя  $\beta$ -галактозидазу (SA- $\beta$ gal) – фермент, ассоциированный с клеточным старением, мы исследовали типы колоний, образованные в культурах стромальных клеток кожи 10 доноров, определив в них долю клеток, положительных по данному ферменту. Самый большой процент SA- $\beta$ gal-положительных клеток был отмечен в диффузных колониях, что подтверждает факт, что данные колонии образованы клетками-предшественниками,

характеризующимися наименьшей пролиферативной способностью. Полученные данные подтверждают также и исследования, выполненные с помощью маркера клеточной пролиферации Ki67, в которых выявлена выраженная обратная корреляция ( $r = -0.85$ ,  $p = 0.02$ ) между процентом диффузных колоний и долей клеток с фенотипом Ki67+. Таким образом, полученные нами данные подтверждают, что диффузные колонии фибробластов, в отличие от плотных колоний, образованы клетками-предшественниками, обладающими меньшим пролиферативным потенциалом и содержат большее количество стареющих клеток. Количественное определение доли диффузных колоний, с нашей точки зрения, может служить эффективным способом оценки степени клеточного старения в популяции стромальных клеток кожи человека и может быть использовано для разработки персонализированного подхода при восстановлении кожи.

Финансирование исследования: ИСКЧ.

**Зубкова Е.С., Стафеев Ю.С., Шевченко Е.К., Цоколаева З.И., Болдырева М.А., Дергилев К.В., Меньшиков М.Ю.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
ver-mishel@mail.ru

### **ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ SDF-1 $\alpha$ И SCF, ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Фактор стволовых клеток (SCF) и фактор стромальных клеток 1 альфа (SDF-1 $\alpha$ ) являются важными регуляторами регенеративных процессов, определяющими дифференцировку и хоуминг стволовых и прогениторных клеток. Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (МСК ЖТ) продуцируют эти факторы, но в незначительном количестве, поэтому мы поставили задачу усилить их продукцию с помощью трансдукции МСК ЖТ аденоассоциированным вирусом 2-го серотипа (AAB). Для этого были получены конструкции на основе AAB, несущие гены SDF-1 $\alpha$  и SCF (человека или крысы). МСК ЖТ были трансдуцированы по ранее отработанным протоколам (Shevchenko E. et al., 2013). Эффективность наработки продуктов трансгенов оценивалась по их средней концентрации в кондиционированных средах (КС), собранных с модифицированных МСК ЖТ. Для SDF-1 $\alpha$  она составила 10–12 нг/мл, а для SCF – 15–17 нг/мл. (в нетрансдуцированных МСК. SDF-1 $\alpha$  – 4,8–5 нг/мл и SCF – 0,035–0,096 нг/мл соответственно). Было показано, что жизнеспособность/пролиферация (МТТ-тест) модифицированных МСК и крысы и человека (как с SDF-1 $\alpha$ , так и с SCF) значительно снижается по сравнению с нетрансдуцированными МСК, при этом не происходит клеточной гибели, но скорость прироста числа модифицированных МСК оказалась существенно ниже, чем у контрольных (немодифицированных) клеток, что свидетельствует о замедлении пролиферации трансдуцированных МСК. В то же время рекомбинантные SDF-1 $\alpha$  (150 нг/мл) и SCF (100 нг/мл) даже в больших дозах не оказывали существенного влияния на пролиферацию МСК (МТТ-тест). Генетическая модификация не влияла на способность МСК ЖТ к характерным дифференцировкам в адипогенном и остеогенном направле-

ниях, а также на их способность к адгезии на матриксные белки. Мы также обнаружили, что среда от трансдуцированных SDF-1 $\alpha$  и SCF МСК оказывает значительный стимулирующий эффект на жизнеспособность c-kit+ стволовых клеток сердца крысы, сравнимый по силе с эффектом фетальной сыворотки и превышающий эффект IGF-1, взятого в концентрации 50 нг/мл. В целом эти результаты указывают на повышение регенеративных свойств МСК при их генетической модификации, усиливающей продукцию SCF и SDF-1 $\alpha$ , что обосновывает их использование для стимуляции регенеративных процессов в тканях, в частности, для трансплантации в поврежденный миокард с целью стимуляции его репарации/регенерации.

Финансирование исследования: *грант РНФ № 16-15-00181.*

**Зубкова Е.С., Дергилев К.В.,  
Белоглазова И.Б., Цоколаева З.И.,  
Болдырева М.А., Ратнер Е.И.,  
Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
cat.zubkova@gmail.com

#### **ВЛИЯНИЕ УРОКИНАЗЫ НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА**

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) принимают активное участие в регенерации, особенно активируясь при травме и воспалении. Восстановление тканевой функции сопровождается ангиогенезом, активацией / миграцией клеток-предшественников и реорганизацией внеклеточного матрикса. Эти эффекты связаны с двумя основными фибринолитическими факторами: активатором плазминогена урокиназного типа (uPA, урокиназой) и рецептором урокиназы (uPAR). Было показано, что uPAR экспрессируется на поверхности МСК и, кроме того, протеолитическая активность урокиназы может регулировать поведение МСК во время регенерации. Цель этой работы состояла в том, чтобы исследовать влияние на МСК, с помощью разработанных в нашей лаборатории рекомбинантных uPA и ее фрагментов: протеолитически неактивной uPA (с мутацией His204Gln (uPA-H / Q)), uPA, не имеющей «ростового» домена ( $\Delta$ GFD), крингл домена (KD) и аминотерминальный фрагмент (ATF). Мы изучали миграцию мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека, а также пролиферацию и секрецию матриксных металлопротеиназ, при воздействии uPA. Мы обнаружили, что uPA и ее рекомбинантные формы не влияют на пролиферацию МСК, с помощью МТТ теста. МСК незначительно мигрировали в ответ на полноразмерную uPA, остальные рекомбинантные формы uPA не оказывали влияния, что полностью соответствует данным, полученным для эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Полноразмерная урокиназа и крингл домен усиливают спонтанную миграцию МСК. Хемотаксис, индуцированный тромбоцитарным фактором роста (PDGF), ослаблялся при добавлении протеолитически неактивной uPA, KD и блокирующих антител к рецептору урокиназы. Урокиназа и все ее рекомбинантные формы индуцировали секрецию матриксной металлопротеиназы-9 в МСК, этот эффект

отсутствовал в PDGF. Эти данные свидетельствуют о том, что система uPA участвует в регуляции миграции и секреции MMP9 с помощью МСК. Модуляция активности урокиназы может рассматриваться как возможный инструмент для индукции регенеративного потенциала МСК.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РНФ № 17-15-01368.*

**Зубов Д.А.<sup>1,2</sup>, Васильев Р.Г.<sup>1,2</sup>, Оксимец В.М.<sup>2</sup>,  
Родниченко А.Е.<sup>1,2</sup>, Злацкая А.В.<sup>1,2</sup>,  
Губарь О.С.<sup>2,3</sup>, Гордиенко И.М.<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup> ГУ «Институт генетической и регенеративной  
медицины НАМН Украины»

<sup>2</sup> Медицинская компания ilaya®

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины

<sup>4</sup> Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины  
zoubov77@yahoo.com

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕ-ИНЖЕНЕРНОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОСТИ: ТРЕХЛЕТНИЙ ПЕРИОД НАБЛЮДЕНИЙ**

Альтернативой существующим методам костной пластики являются методы восстановления кости, основанные на подходах регенеративной медицины. Наша технология основана на трансплантации трехмерного ткане-инженерного живого эквивалента кости (3D ТИЭК). В современной модификации 3D ТИЭК состоит из обработанного бесклеточного аллогенного костного блока необходимого размера и формы (для циркулярных дефектов), или костных чипсов или крошки (для тангенциальных дефектов). Аллогraftы используются в качестве остеоиндуктивных и остеокондуктивных носителей для культивированных аутологичных остеопрогениторных КМ-ММСК и остеопрогениторных клеток периоста (ОПКП), предназначенных для формирования критической клеточной массы для регенерации кости в зоне дефекта, и эндотелиальных прогениторных клеток периферической крови (ЭПК-ПК), предназначенных для усиления васкуляризации изготовленного 3D ТИЭК.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Клетки. Терапевтическую дозу всех трех культивированных клеточных типов получали в среднем за 30 дней. Пациенты. На настоящий момент пролечено 47 пациентов, которые были включены в программу лечения на основании вывода биоэтической комиссии и подписанного с пациентом информированного согласия, у 39 раненых лечение дефектов костной ткани завершено. Лечение проводилось на основании утвержденного МОЗ Украины локального протокола. Пациенты имели циркулярные и тангенциальные дефекты трубчатых костей различной протяженности (всего 28 дефектов). Оценка эффективности лечения проводилась на основании рентгенологических исследований (3 и 6 мес. после трансплантации). В некоторых случаях во время выполнения адаптационной резекции трансплантата с согласия пациента забирался краевой фрагмент ремоделированного трансплантата, который в дальнейшем подвергался патоморфологическому анализу (3 мес. после трансплантации). Гистопрепараты окрашивались гематоксилином-эозином.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Общее количество раненых с последствиями боевых ранений конечнос-

тей, которым проводится лечение с использованием клеточных технологий — 47 (мужчин — 46, женщин — 1), у 39 раненых лечение дефектов костной ткани завершено. У 47 раненых имелось 52 дефекта костной ткани различной локализации: 20 — нижняя конечность и 32 — верхняя конечность. На этапе лечения по замещению дефектов находится 8 человек. Возраст раненых от 21 года до 48 лет (средний возраст 33,9 лет). До поступления в клинику раненым было выполнено от 2 до 27 операций (в среднем 5,7 операций). Раненые поступали через 2–22 мес. после ранения (в среднем через 10,1 мес.). Трансплантация 3D ТИЭК в виде костных блоков была выполнена 10 раненым, в виде чипсов — 22 раненым, и в виде костных блоков и чипсов — 13 раненым. Объем трансплантата колебался от 10 до 180 см<sup>3</sup> (в среднем — 40,4 см<sup>3</sup>). Плотность засева трансплантата составляла в среднем 5,7 млн клеток на 1 см<sup>3</sup>. Общая эффективность лечения дефектов костей конечностей, полученных в результате боевых ранений, с использованием 3D ТИЭК составила 90,4%.

Финансирование исследования: *Целевое финансирование Медицинской компании ilaya® (ООО «А.А. Партнерс», Киев, Украина).*

**Зурина И.М.<sup>1,2</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1,3</sup>, Горкун А.А.<sup>1,2</sup>, Колокольцова Т.Д.<sup>1,4</sup>, Борзенко С.А.<sup>5</sup>, Репин В.С.<sup>1,4</sup>, Сабурин И.Н.<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет

<sup>3</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России

<sup>5</sup> МНТК Микрохирургии глаза им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России izurina@gmail.com

### **СОХРАНЕНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК В 3D КУЛЬТУРЕ**

Обратимые переходы эпителия в мезенхиму (ЭМП) играют ключевую роль в эмбриогенезе, нормальной и патологической регенерации. Повреждения эпителиальных выстилок, в условиях хронических воспалительных процессов, способствуют формированию соединительнотканых рубцов, необратимо нарушают структуру и функцию органов. Поэтому восстановление эпителиальных выстилок является одной из первоочередных задач регенеративной медицины. В стандартных условиях 2D культуры эпителиальные клетки уже после первого пассажа начинают проходить ЭМП, что не позволяет получать большие количества эпителиальных клеток.

**ЦЕЛЬ.** Изучение возможности поддержания эпителиального фенотипа клеток в условиях 3D культуры. Использовали два типа эпителия — первичные культуры клеток буккального эпителия (БЭ) слизистой ротовой полости и пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). Клетки культивировали до 4 пассажа в стандартных 2D условиях (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 3D культивирование осуществляли в агарозных планшетах, полученных при помощи 3DPetriDish (Microtissue, США). Цейтраферную фоторегистрацию культур осуществляли на приборе Cell-IQ (CMTechnologies,

Финляндия). Для анализа экспрессии маркеров применяли методы проточной цитометрии и иммуноцитохимии. Структурный и ультраструктурный анализ был проведен с применением методов гистологии и электронной микроскопии. В условиях 2D культуры клетки БЭ 1 пассажа имели морфологию «бульжонной мостовой» и эпителиальный фенотип (ZO1+, СК19+, EpCAM+). На 4 пассаже в культуре БЭ наблюдали признаки ЭМП и появление клеток со смешанным и мезенхимным фенотипом: экспрессия EpCAM снижалась с 94% до 50%, экспрессия NCAM и CD44 возрастала с 9,9% до 85% и с 25% до 90%, соответственно. В первичной 2D культуре ПЭС наравне с эпителиальным фенотипом (ZO1+) уже на 1 пассаже наблюдали признаки ЭМП — ко-экспрессию E- и N-кадгеринов. На 2 пассаже количество клеток с мембранной локализацией ZO1 снижалось, в цитоплазме экспрессировался виментин — маркер мезенхимных клеток. В условиях 3D культуры клетки БЭ и ПЭС за 7 сут формировали плотные жизнеспособные сфероиды. 3D культивирование клеток БЭ 2–4 пассажа способствовало восстановлению и поддержанию эпителиального (ZO1+, СК19+) фенотипа клеток в сфероиде. В 3D культурах ПЭС восстановление признаков эпителиальных клеток наблюдали в сфероиде из клеток 2 пассажа, тогда как в сфероиде из клеток 4 пассажа происходило лишь частичное восстановление фенотипа — между клетками формировались единичные плотные (ZO1+) и адгезионные (E-кадгерин+) контакты. Таким образом, эпителиальные клетки, полученные из разных источников, исходно обладают разным потенциалом к ЭМП, их пластичность тканеспецифична. 3D культивирование позволяет поддерживать популяцию эпителиальных клеток. При сдвиге статуса исходных клеток в монослойной культуре от эпителиального к мезенхимному, снижается возможность вернуться в 3D культуре к полноценному эпителиальному фенотипу.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке Правительства РФ отделением РАН (Программа III.12).*

**Фидаров А.Ф.<sup>1</sup>, Зурина И.М.<sup>2,3</sup>, Горкун А.А.<sup>2,3</sup>, Кошелева Н.В.<sup>2,4</sup>, Сабурин И.Н.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет

<sup>4</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова izurina@gmail.com

### **БИОИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И 3D КУЛЬТУРЫ АУТОЛОГИЧНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ В АНГИОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ, ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ**

АКТУАЛЬНОЙ проблемой современной травматологии и имплантологии является разработка средств и методов восстановления обширных дефектов костной ткани, возникших вследствие травмы, а также патологических процессов воспалительно-деструктивной или опухолевой природы. В настоящее

время одним из перспективных направлений является создание тканеинженерных конструкций на основе остеокондуктивных носителей, остеоиндуктивных факторов роста и остеогенных прогениторных клеток. Однако, для эффективной репарации обширных повреждений костной ткани важно создание васкуляризованных конструкций.

**ЦЕЛЬ.** Разработка биоинженерной конструкции на основе остеопластического биоактивного материала БАК-1000 и индуцированных в ангиогенном направлении сфероидов из стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ).

У самцов крыс линии SD осуществляли забор жировой ткани из паховой области для получения первичных монослойных культур СКЖТ. Для получения сфероидов, индуцированных в ангиогенном направлении, клетки переводили в неадгезивные условия на агарозные планшеты 3DPetriDish (Microtissues, USA), и культивировали в среде с добавлением VEGF, в стандартных условиях (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Сформированными 7-дневными сфероидными заселяли блоки материала БАК-1000. На 7-е сутки полученные конструкции фиксировали в глутаровом альдегиде для анализа методом растровой электронной микроскопии. Для оценки эффективности разработанной биоинженерной конструкции самцам крыс линии SD хирургическим путем создавали обширный костный дефект в диафизе бедренной кости с последующим восполнением места повреждения полученной биоинженерной конструкцией. Контролем были животные, которым имплантировали остеопластический материал БАК-1000 без заселения сфероидными. Животных выводили из эксперимента на 30, 60 и 120 сут. При исследовании матрицы, заселенной VEGF-индуцированными сфероидными СКЖТ, через 7 сут. наблюдали большое количество клеток как на поверхности, так и в порах матрицы, а также формирование тубулоподобных структур. Анализ гистологических срезов костной ткани животных из области повреждения показал, что имплантация биоинженерной конструкции, заселенной сфероидными, приводила к резкому увеличению числа сосудов капиллярного типа уже на 30 сут. после операции. Интенсивный ранний ангиогенез после имплантации сопровождался активным образованием костных структур *de novo* уже на 30–60 сут. В контрольной группе животных не наблюдали активного ангиогенеза, но наблюдали, одновременно с формированием костной ткани, появление большого количества грубоволокнистой соединительной ткани. Разработка и создание сложных многокомпонентных тканеинженерных конструкций позволяет не только разрабатывать новые методы лечения пациентов с обширными дефектами костной ткани, но и открывает дорогу к созданию новых инновационных медицинских технологий для протезирования, имплантологии и трансплантологии.

**Зюзьков Г.Н.<sup>1,2</sup>, Удут Е.В.<sup>1</sup>,  
Мирошниченко Л.А.<sup>1</sup>, Полякова Т.Ю.<sup>1</sup>,  
Жданов В.В.<sup>1</sup>, Удут В.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ  
<sup>2</sup> Томский государственный университет  
zgn@pharmso.ru

### **СТРАТЕГИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ В РЕГЕНЕРАТОРНО-КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ**

Фармакологическое действие существующих лекарственных средств заключается преимущественно в защите, либо в модуляции функций сохранившихся в условиях патологии зрелых клеточных элементов. Данная концепция фармакологического вмешательства в ряде случаев является несостоятельной. Достижения в области клеточных технологий привели к возможности развития нового направления таргетной терапии в регенеративной медицине — «Стратегии фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в регенераторно-компетентных клетках», предполагающей использовать в качестве мишеней отдельные сигнальные молекулы, вовлеченные в процесс реализации ростового потенциала тех или иных элементов. При этом выявление относительной специфики передачи сигнала в различных типах клеток позволит рассчитывать на создание селективных средств.

**ЦЕЛЬ.** Выявить специфику участия отдельных звеньев внутриклеточной сигнальной трансдукции в реализации функций регенераторно-компетентных клеток различных типов. Оценить возможность стимуляции регенерации пораженных патологическим процессом тканей с помощью некоторых модификаторов активности сигнальных молекул.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** С помощью культуральных, иммунологических и др. методов в условиях *in vitro* изучали роль: NF-κB, IKK, PKC, PKB, PI3K, ERK 1/2, p38, аденилатциклазы, PKA, JAKs, STAT3, JNK, p53 в реализации функций прогениторных элементов различных классов и клеток-регуляторов микроокружения тканей. На моделях постгипоксической энцефалопатии, кожной раны и цитостатической миелосупрессии у экспериментальных животных исследовали терапевтические эффекты и механизмы действия ингибиторов JNK и модификаторов активности цАМФ/РКА-сигналинга (ингибиторов фосфодиэстеразы цАМФ и РКА).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлена специфика участия ряда сигнальных молекул в регуляции клеточного цикла и развития клеток-предшественников различных классов, а также ключевая роль отдельных вторичных мессенджеров в продукции гуморальных факторов клетками микроокружения тканей. Определены перспективные мишени воздействия, в том числе в цитокин-продуцирующих клетках. На модели постгипоксической энцефалопатии обнаружены нейропротекторные и регенеративные эффекты ингибиторов JNK, связанные с активацией нейтральных СК головного мозга. Выявлено нарушение регенерации ткани под влиянием активатора цАМФ-сигналинга (на модели системы крови) и, напротив, стимулирующие регенерацию свойства ингибитора РКА (на модели кожной раны). В условиях цитостатической миелосупрессии продемонстрирована эффективность профилактического и терапевтического введения ингибитора JNK.



Вскрыта зависимость развития компенсаторных реакций от повышения функциональной активности кроветворных предшественников на фоне неоднозначной реакции со стороны прогениторных и зрелых элементов гемопоэзинулирующего микроокружения.

**ВЫВОДЫ.** Показана перспективность использования внутриклеточных сигнальных молекул в регенераторно-компетентных клетках в качестве мишеней средств для регенеративной медицины. Создана основа новой «Методологии разработки таргетных гемостимуляторов».

#### **Иваненко А.А.**

*Нижегородская государственная медицинская академия*

alexander.ivanenko@gmail.com

#### **МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ НЕТРАНСГЕННЫХ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ КОРТИКАЛЬНОГО ТИПА ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

В настоящее время человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут быть дифференцированы практически в любой тип нейронов (Ho et al., 2015). Методы дифференцировки варьируются от интеграции пронейральных факторов в геном с помощью лентивирусных векторов до нетрансгенных (transgene-free) методов, использующих малые молекулы и имитацию эмбриогенеза. Методы на основе малых молекул, микроРНК и аппликации белковых факторов требуют значительного времени для дифференцировки (месяцы) и характеристики результата сильно варьируют от эксперимента к эксперименту. В то же время, трансгенные методы обычно обеспечивают быстрое репрограммирование (1–2 нед., Ho et al., 2015; Zhanget al., 2013) и обеспечивают стабильность фенотипа и функциональных характеристик результата. Серьезным ограничением применения трансгенных методов является возможный вставочный мутагенез (Rahim et al., 2009) и, как следствие, потенциальная опасность использования трансгенных клеток в задачах регенеративной медицины. Также, для использования в качестве модельных культур при разработке лекарственных средств и в фундаментальных исследованиях предпочтительней использование клеток с интактным генотипом. Наиболее распространённым типом кортикальных нейронов у млекопитающих и наиболее востребованным в исследованиях является глутаматергический возбуждающий нейрон. Известен и широко используется метод получения трансгенных глутаматергических нейронов из ИПСК на основе интеграции пронейрального фактора Ngn2 (Zhanget al., 2013, Frega et al., 2017, Ho et al., 2016, Busskamp et al., 2014). В то же время, неизвестны надежные методы быстрой дифференцировки нетрансгенных клеток того же типа. На основе принципа оверэкспрессии фактора Ngn2 и известных неинтегрирующих (integration-free) методов доставки генов (Deng et al., 2015; Schlaeger et al., 2014; Rahim et al., 2009) была разработана методика направленной дифференцировки ИПСК в глутаматергические нейроны кортикального типа без модификации их генома. Были опробованы следующие методы доставки пронейрального фактора:

- доставка с помощью векторов вируса Сендай;

- доставка мРНК;
- не-интегрирующиеся лентивирусные векторы;
- эписомальные векторы.

Оценки эффективности репрограммирования проводилась с помощью транскриптомного анализа и методов иммуноцитохимии. Для оценки функциональных характеристик был проведен ряд экспериментов с результирующими клетками как *in vitro*, с использованием мультиэлектродных матриц, так и *in vivo*, путем имплантации индуцированных нейронов в мозг животных. Полученные результаты показали, что эффективность опробованных нетрансгенных методов индукции глутаматергических нейронов сравнима с эффективностью широко используемых методов трансгенной индукции. Разработанный эффективный метод получения глутаматергических нейронов из ИПСК открывает новые перспективы использования стволовых клеток в тканезаместительной терапии нейродегенеративных заболеваний и последствий черепно-мозговых травм.

#### **Иванов А.В., Кожевников О.В., Омельяненко Н.П., Ильина В.К.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России*

cito10ivanov@mail.ru

#### **ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ СОЕДИНИТЕЛЬНОВИДНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ВРОЖДЕННОЙ ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ, СОПРОВОЖДАЮЩЕЙСЯ НЕРАВЕНСТВОМ ДЛИНЫ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ДЕТЕЙ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Снижение темпов остеорепарации в области повреждения кости у детей с врожденной патологией опорно-двигательного аппарата встречается чаще при хирургической коррекции неравенства длины нижних конечностей и попытках сращения врожденных ложных суставов.

**ЦЕЛЬ.** Оценить результаты использования культивированных аутологичных соединительнотканых клеток костного мозга для стимуляции репаративных костных регенератов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** За период с 2006 по 2016 г. обратная трансплантация культивированных аутологичных соединительнотканых клеток костного мозга выполнена в 31 случае. Группа пациентов с неравенством длины нижних конечностей представлена 20 пациентами в возрасте от 3,7 до 16 лет. Вторую группу составили пациенты с ложными суставами: 4 пациента в возрасте от 1,4 до 9 лет и пациент 2,9 лет с приобретенным ложным суставом локтевой кости. У пациентов с врожденными ложными суставами после резекции зоны ложного сустава и сращения последнего проводили удлинение сегмента (у двух пациенток неоднократно). Во всех случаях использовали обратную трансплантацию культивированных аутологичных соединительнотканых клеток костного мозга в область репаративного костного регенерата. Группа контроля состояла из 24 пациентов в возрасте от 2,5 до 14 лет с неравенством длины нижних конечностей. Хирургическую коррекцию осуществляли согласно принципам компрессионно-дистракционного метода Илизарова Г.А. Соединительнотканые клетки костного мозга получали из

биоптата крыла подвздошной кости. Культивирование клеток проводили по стандартной методике. Клеточную терапию проводили инъекциями в репаративный регенерат согласно специальному протоколу. Оценку созревания distractionного регенерата на этапах удлинения проводили клинико-рентгенологическим и сонографическим методами и методом лазерной доплеровской флоуметрии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показатели остеосинтеза при проведении удлинения сегмента составили: индекс фиксации 28,9–30,5, индекс остеосинтеза составил 34,2–38,6. Сроки фиксации аппарата были в пределах 1,1±0,1 мес. на 1 см компенсации неравенства длины. Продолжительность лечения составила 4,5–6,5 мес. В контрольной группе индекс фиксации 40,6–43,8. Индекс остеосинтеза находился в пределах от 50,7 до 55,9. Сроки фиксации аппарата на 1 см distractionного регенерата составили 1,3–1,85 мес. Сроки лечения составили 7,5–11 мес. У пациентов с ложными суставами получено сращение фрагментов кости в области резекции ложного сустава во всех случаях. Консолидация концов костных фрагментов прошла по типу первичного сращения. Сроки фиксации в аппарате составили от 5 до 7,5 мес. Рецидива ложного сустава в области резекции в пятилетний период не отмечено.

**ВЫВОДЫ.** Клиническое применение клеточной терапии показало выраженное оптимизирующее действие на репаративную костную регенерацию при инъекционной форме местного введения культивированных аутологических соединительнотканых клеток костного мозга.

**Иванова О.А.<sup>1</sup>, Комарова М.Ю.<sup>1</sup>,  
Хромова Н.В.<sup>2</sup>, Костарева А.А.<sup>2</sup>,  
Дмитриева Р.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России  
astroksana@gmail.com

### **СОГЛАСОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРО-МИОГЕННЫХ И ПРО-АДИПОГЕННЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В МИОБЛАСТАХ ЛИНИИ C2C12**

**ВВЕДЕНИЕ.** Скелетная мускулатура обладает большим потенциалом к регенерации, который реализуется за счет взрослых стволовых клеток мышечной ткани — сателлитных клеток. Нарушения регуляции миогенеза приводят к деградации мышечной ткани и ее замещению на жировую и фиброзную. Точные механизмы деградации скелетной мускулатуры остаются невыясненными.

**ЦЕЛЬ.** Проверка гипотезы о том, что про-миогенные и про-адипогенные сигналы при дифференцировке и регенерации скелетной мускулатуры действуют согласованно.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В работе использовали клеточную линию мышечных миобластов C2C12. Стимуляцию C2C12 проводили с использованием среды с низким содержанием лошадиной сыворотки (DM1) и стимулирующего адипогенез коктейля (DM2). На второй (д2), четвертый (д4) и шестой (д6) дни выделяли РНК. На д6 клетки фиксировали для иммуноцитохимической окраски миотрубок (антител к MYHC), адипоциты визуализировали OilRedO.

Размеры миотрубок определяли с использованием программного обеспечения ZeissZen. Экспрессию определяли qPCR, результаты нормализовали к dO. Статистическая обработка: t-тест.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** DM1 и DM2 стимулировали формирование миотрубок. Однако их морфология различалась: DM1 стимулировала формирование трубок с длиной 320±80 и шириной 22±4 мкм, а DM2 — коротких (150±28) и узких (12±5 мкм). Большая часть трубок (47%) в DM2 образована слиянием 3–4 ядер, в DM1 — (73%) слиянием 4–15 миобластов. Общий коэффициент слияния выше в DM2: 37±3% против 19±2%. В DM1-стимулированных культурах происходило формирование исключительно миотрубок, в DM2 культурах формировались как MYHC+ трубки, так и OilRed+ адипоцитоподобные клетки. Экспрессия гена Myomaker в культурах хорошо коррелировала с активностью слияния миобластов. При DM1-стимуляции экспрессия гена резко возрастала на д2 (35±4) и снижалась только на д6 (177±36). При DM2-стимуляции экспрессия Myomaker повысилась только на д4 (7.3±0.4), на д6 снизилась (3.9±0.1). Экспрессия MyoG коррелирует с Myomaker для DM1 на д2 (42±9), но снижая рост к д4 (20±3). DM2-стимуляция сопровождалась снижением экспрессии MyoG на д2 (0.35±0.03) и ростом на д4 (4.5±0.9). Экспрессия Myf6 при DM1 стимуляции возрастала (2.2±0.1, д2) и снизилась только на 6-й день (4±0.6). При DM2-коктейля экспрессия Myf6 достигала пика уже на д2 (40±8), превышая в течение 4 дней уровни Myomaker и MyoG. Экспрессия маркера адипогенеза FABP4 согласовывалась с детекцией OilRed+ клеток в DM2 культурах. При DM1-стимуляции наблюдался спад экспрессии (0.21±0.07, д6), при DM2 — существенный рост (122±13 на д4).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** На модели клеточной линии мышечных миобластов C2C12 мы показали согласованность и взаимное влияние сигнальных путей, регулирующих жировую и мышечную дифференцировки in vitro.

Финансирование исследования: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ Соглашение № 16-15-10178 от 18 мая 2016 г.

**Иванова Ю.С., Пуговкина Н.А., Никольский Н.Н., Люблинская О.Г.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
ju.s.ivanova@yandex.ru

### **ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА САМООБНОВЛЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

В клинической практике антиоксиданты широко используются для профилактики и лечения различных заболеваний. Однако сравнительно недавние исследования показали, что нарушение баланса внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) под действием высоких доз антиоксидантов негативно влияет на клеточную пролиферацию дифференцированных и тканеспецифических стволовых клеток, вызывая блокирование клеточного цикла. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются основой формирования всех органов и тканей человека. В связи с этим нормальное протекание процесса клеточного деления ЭСК с сохранением целостности генетического материала является очень важным фактором для их дифференцированных клеток-потомков. Однако вопрос о влиянии антиоксидантов

на процесс самообновления ЭСК пока остается неизученным. Таким образом, цель данной работы состоит в исследовании влияния высоких доз антиоксидантов ресвератрола и Темпола на динамику и регуляцию клеточного цикла ЭСК. В процессе выполнения работы показано, что направленное изменение внутриклеточного уровня АФК под действием антиоксидантов приводит к блоку клеточного цикла в G1 фазе. В дополнение к этому, замедление клеточной пролиферации сопровождается понижением уровня одного из ключевых белков-регуляторов цикла – циклина А. Кроме того, количество двунитевых разрывов ДНК у клеток, подвергшихся действию антиоксидантов, оказалось в несколько раз больше по сравнению с контрольными культурами ЭСК. Таким образом, данная работа свидетельствует о том, что направленный сдвиг баланса АФК с помощью высоких доз антиоксидантов приводит к нарушению пролиферации и целостности генома ЭСК.

Финансирование исследования: *грант РНФ № 14-50-00068.*

**Ивукина Е.А.<sup>1</sup>, Истранов Л.П.<sup>1</sup>, Истранова Е.В.<sup>1</sup>, Чурбанов С.Н.<sup>2</sup>, Шавкута Б.С.<sup>2</sup>, Зайцева Н.Н.<sup>1</sup>, Кузнецова Д.С.<sup>3</sup>, Курков А.В.<sup>1</sup>, Мельников П.А.<sup>4</sup>, Вишневский Д.А.<sup>4</sup>, Шехтер А.Б.<sup>1</sup>, Загайнова Е.В.<sup>3</sup>, Рочев Ю.А.<sup>1</sup>, Тимашев П.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины*

<sup>2</sup> *Институт фотонных технологий ФНИЦ*

*«Кристаллография и фотоника» РАН*

<sup>3</sup> *Нижегородская государственная медицинская академия, Институт биомедицинских технологий*

<sup>4</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им.*

*В.П. Сербского Минздрава России grebeneka@gmail.com*

#### **КСЕНОПРОТЕЗЫ НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ БЫЧЬИХ ПЕРИКАРДОВ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ВНУТРЕННИХ ВЫСТИЛОК С РЕГУЛИРУЕМЫМИ БИОМЕХАНИЧЕСКИМИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

Ксенопротезы на основе перикардов млекопитающих широко применяют в области тканеинженерной реконструкции мягких тканей [1]. Одним из ключевых этапов разработки ксенопротезов является процесс децеллюляризации, который направлен на устранение иммуногенности продукта. Однако в результате децеллюляризации происходит снижение показателей протеолитической устойчивости, что приводит к сокращению срока службы ксенопротезов. Этот эффект компенсируют посредством стабилизации освобожденных от клеток матриц, состоящих преимущественно из коллагена и эластина, с участием сшивающих агентов. Традиционно для этих целей используют глутаровый альдегид, что зачастую сопровождается снижением показателей биосовместимости ксенопротезов, связанным с увеличением жесткости и стимулированием цитотоксичности. В то же время, эффект от существующих аналогов [2, 3] изучен не полностью. Наш проект направлен на всестороннее изучение влияния сшивающих агентов различной природы, включая гексаметилен диизоцианат (ГМДЦ), диглицидиловый эфир этилен-

гликоля (ДЭЭГ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (ЭДАК) и генипин, на механические, структурные и функциональные свойства децеллюляризованных тканей бычьих перикардов. Нами показана общая тенденция к структурной реорганизации коллагеновых фибрилл и уменьшению анизотропии механических свойств после обработки матриц сшивающими агентами. Более того, под действием генипина матрицы приобретали изотропные свойства. Протеолитическая устойчивость заметно варьировала в зависимости от типа сшивающего агента от 6% (для ЭДАК) до 94% (для ДЭЭГ) в рамках протокола измерений. Температура сваривания образцов в результате стабилизации увеличивалась в среднем на 10°C. Однако при использовании ДЭЭГ разница была наименьшей. Структурный анализ проводили на установках сканирующей электронной микроскопии, двухфотонной микроскопии и при гистохимическом окрашивании образцов. По результатам исследования образцы были охарактеризованы, как бесклеточные губчатые структуры, состоящие из коллагеновых септ, окружающих поры. Отмечено, что в результате обработки сшивающими агентами в составе матриц происходило утолщение и параллелизация волокон. Таким образом, использование различных приемов химической стабилизации позволяет добиться оптимизации свойств ксенопротезов и потенциально расширяет спектр их применения при тканеинженерной реконструкции.

*Литература:*

1. Mathapati S, Bishi DK, Guhathakurta S., et al. Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering. *Mater Sci Eng* 2013; 33: 1561-1572.

2. Sung HW, Chang Y, Chiu CT, et al. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *J Biomed Mater Res, Part A* 1999; 47: 116-126.

3. Deeken CR, Eliason BJ, Pichert MD, et al. Differentiation of biologic scaffold materials through physicochemical, thermal, and enzymatic degradation techniques. *AnnSurg* 2012; 255: 595-604.

Финансирование исследования: *Российский научный фонд (грант № 17-15-01487), грант Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.*

**Измайлов А.А., Фадеев Ф.О., Баширов Ф.В.**

*Казанский государственный медицинский университет gostev.andrei@mail.ru*

#### **АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ-СТИМУЛЯТОРЫ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ, В ЦНС С ПОМОЩЬЮ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

Проблема терапии нейродегенеративных заболеваний, ишемических инсультов и нейротравм остаётся одной из актуальных в фундаментальной и практической медицине. С целью преодоления последствий нейродегенерации, нами был предложен метод доставки терапевтических молекул в ЦНС с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека, одновременно сверхэкспрессирующих рекомбинантные гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии

(NCAM). На мышах с моделью бокового амиотрофического склероза (БАС) мы продемонстрировали, что внутривенная инъекция МККП, трансдуцированных аденовирусными векторами, несущими VEGF и GDNF имели позитивное влияние на исход заболевания (Islamov, 2015, 2016). Для увеличения выживаемости и обеспечения адресной миграции МККП, мы дополнительно трансдуцировали МККП аденовирусным вектором, кодирующим NCAM. Такая генно-клеточная конструкция (МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM) была успешно апробирована на крысах (Islamov, 2017a) и мини-свиньях (Islamov, 2017b) с моделью контузионной травмы спинного мозга. В настоящее время эффективность конструкции МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM доказана для терапии ишемического инсульта головного мозга в моделях на крысах. Интратекальная инъекция МККП, экспрессирующих трансгены молекул-стимуляторов нейрорегенерации (VEGF, GDNF и NCAM), в течение 4 ч. после окклюзии артерий головного мозга оказывают выраженный позитивный эффект на сохранность вещества коры головного мозга и функциональное восстановление нейронов. Результаты наших исследований позволили установить целесообразность применения МККП для доставки терапевтических генов в область нейрорегенерации, которая обусловлена: 1) высоким уровнем трансдукции МККП и подтвержденной экспрессией терапевтических генов; 2) миграцией МККП через гемато-энцефалический барьер и их высокой жизнеспособностью в ЦНС реципиента; 3) адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область нейрорегенерации с помощью МККП; 4) секрецией МККП собственных биологически активных молекул, способствующих нейрорегенерации; 5) действием терапевтических молекул, продуцируемых МККП, на клетки-мишени по паракринному или эндокринному механизму; 6) естественной дифференцировкой трансплантированных МККП в ЦНС реципиента в клетки микроглии и эндотелиальные клетки; 7) трансплантацией МККП без учета гистосовместимости по HLA; 8) возможностью контролировать трансдукцию клеток реципиента аденовирусным вектором. Таким образом, МККП могут служить эффективным носителем для доставки терапевтических генов в ЦНС при нейрорегенеративных заболеваниях, ишемическом инсульте и нейротравме.

Финансирование исследования: *Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда № 16-15-00010.*

**Ильина В.К., Омельяненко Н.П., Иванов А.В., Кожевников О.В., Прохорова Е.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России  
ilina6774128@yandex.ru

#### **КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА**

Клинические наблюдения показывают высокий коэффициент неудачных результатов заживления поврежденных костей, которое может оказаться неполноценным (ложные суставы) или замедленным. Уменьшенная репаративная способность, включая нарушенное формирование кости, может быть вызвана дефектами в стромальных стволовых клетках,

которые приводят к сниженной пролиферации и остеобластической дифференцировке. В связи с этим становится очевидной необходимость воздействия на репаративные процессы в зоне проводимой коррекции. Настоящая работа представляет методы клеточной терапии для стимуляции репаративных процессов у детей в клинике травматологии и ортопедии. Комплексное лечение с использованием клеточной терапии проведено 30 пациентам в возрасте от 2 до 15 лет с неравенством длины конечностей и врожденными ложными суставами костей голени. В работе использовались клеточные культуры аутологичных стромальных костномозговых клеток, выделенных из биоптата крыла подвздошной кости. Одновременно с наращиванием клеточных культур для обратной аутологичной трансплантации изучалась эффективность колониеобразования этих клеток. Нарушения формирования колоний: снижение эффективности клонирования и снижение доли многослойных колоний отражали изменение потенции регенерации костной ткани и объективно давали основание для показания клеточной терапии данным пациентам. Перед трансплантацией клеток культуры проходили многочисленные контроли. Клеточная суспензия (5–10 млн клеток) в физиологическом растворе инъецировалась непосредственно в область distraction через 3–4 нед. после ее начала, в момент формирования рыхлой соединительной ткани в зоне коррекции. Результаты проведенного исследования показали не только сокращение сроков созревания регенерата, но и значительное улучшение качества его после динамической стимуляции в периоде коррекции длины кости. У пациентов с врожденным ложным суставом костей голени удалось добиться начала консолидации после резекции ложного сустава уже через 2,5 мес. после операции. В области distraction у этих пациентов формировались регенераты высокой рентгенологической плотности. Оценка состояния регенерата осуществлялась не только по данным рентгенографии, но и по данным ультразвукового исследования. При выполнении УЗИ контроля в динамике через 1 мес. после начала стимуляции регенерата мы отмечали высокую скорость артериального кровотока по сосудам регенерата с низким индексом резистентности ( $RI = 0,4$ ). Сонографически через 2,5 мес. отмечались участки костного регенерата с плотным кортикальным слоем, что является одним из показателей ускоренной остеорепаляции. Таким образом, положительный результат использования клеточных технологий для стимуляции остеорепаляции открывает перспективы для более эффективного лечения патологий опорно-двигательного аппарата.

**Исаева Т.Н., Смагин М.А., Демура А.Ю., Суровцева М.А., Ким И.И., Лыков А.П., Повещенко О.В., Нимаев В.В.**

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН  
phmshonok@mail.ru

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА И ЛОКАЛИЗАЦИИ С ПОМОЩЬЮ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ЛИЗАТОМ ТРОМБОЦИТОВ**

Трофические язвы по разным оценкам встречаются у 3–7% населения, часто являются прогрессирующими и длительно незаживающими, что

приводит к уменьшению продолжительности и качества жизни пациентов. Рутинные способы лечения обычно малоэффективны, поэтому разрабатываются новые стратегии. Известно, что при разрушении мембраны тромбоцитов из альфа-гранул в плазму выходят факторы роста, стимулирующие миграцию и пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, которые являются потенциальным источником для регенерации тканей. В исследовании включено 54 пациента с трофическими язвами, сопоставимые по возрасту, полу и заболению. Пациенты разделены на группы: трофические язвы при синдроме диабетической стопы (29), язвы, вызванные хронической венозной недостаточностью (14), трофические язвы смешанного генеза (8), неуточненной этиологии (3). 33 больным, дополнительно к традиционной схеме ведения ран и сопутствующей патологии, дважды с интервалом в 5 дней параульцерозно вводилось 3-4 мл аутологичной плазмы, обогащенной лизатом тромбоцитов (АПОЛТ). Группу сравнения составил 21 пациент без введения АПОЛТ. В лаборатории клеточных технологий в условиях стерильного бокса АПОЛТ получали в два этапа: 1. Аутологичную плазму, полученную из периферической крови пациента, осаждали в течение 6 мин. при 3800 об/мин на центрифуге (EBA20, Hettich, Германия) в пробирках (Plasmolifting™), содержащих натрия гепарин со специализированным тиксотропным гелем. Подсчитывалось количество тромбоцитов и клетки концентрировались в 1 мл плазмы. 2. Лизат тромбоцитов получали после 2 циклов замораживания в жидком азоте и размораживания в воде с температурой 37°C, фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм для удаления фрагментов разрушенной мембраны тромбоцитов. Полученный лизат добавляли к аутологичной плазме. Половину АПОЛТ замораживали и хранили при -70°C до повторного применения. У пациентов, получивших лечение АПОЛТ, единичные язвенные дефекты кожи встречались в 72,73% (24) случаев, а множественные – в 27,27% (9) случаев. В контрольной группе пациентов в 80,05% (17) случаев выявлены одиночные язвенные дефекты, в 19,05% (4) случаев множественные. Показано, что сочетание традиционного лечения с введением АПОЛТ приводит к ускорению заживлению язвенных дефектов на момент выписки на 46,7% от исходного значения, а в контроле – на 17,4%. В динамике наблюдения через 3 мес. от момента выписки пациентов из стационара в опытной группе пациентов скорость эпителизации язвенного дефекта кожи нижних конечностей составила 78,03% (0 – 100%) от исходного значения, а в контроле – 61,57% (10,3 – 78,34%). Динамика раневого процесса неоднородна для групп пациентов с различным генезом кожных дефектов. Также показано, что менее эффективно лечение у пациентов с избыточной массой тела и обширными язвами неясного генеза. Проводится последующее наблюдение за пациентами.

**Калабушева Е.П.<sup>1</sup>, Черных Э.С.<sup>1</sup>,  
Рябинин А.А.<sup>2</sup>, Воротеяк Е.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова  
Kalabusheva.E@gmail.com

### **МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ЗАЧАТКА ВОЛОСЯНОГО Фолликула в культуре**

Волосной фолликул (ВФ) развивается благодаря взаимодействию между эпителиальными и мезенхимными клетками. Постнатальные мезенхимные клетки ВФ области дермальной папиллы (ДП) способны индуцировать формирование новых ВФ при трансплантации в интактный афолликулярный эпидермис. Изучение взаимодействия клеток ДП и эпидермальных кератиноцитов (КЦ) *in vitro* позволит определить ключевые факторы морфогенеза ВФ с одной стороны и основные принципы реконструкции зачатков эпителио-мезенхимных органов человека в культуре с другой. Эпидермальные КЦ реагируют на сигналы со стороны клеток ДП в культуре. Среда, кондиционированная клетками ДП, вызывает формирование трубочко-подобных структур КЦ на поверхности коллагенового геля и повышает экспрессию профолликулярных маркеров. Однако только совместное культивирование стимулирует WNT сигналинг, необходимый для развития и регенерации ВФ. Учитывая эти результаты, сконструировали несколько моделей совместных культур КЦ и клеток ДП в 3D условиях. Наиболее удачной оказалась модель смешанных агрегатов: суспензии клеток ДП и КЦ ко-культивировали в висячих каплях. В ходе самоорганизации КЦ формировали удлиненные трабекулы, которые вдавались в сфероиды клеток ДП. Методами иммунохимии и количественного ПЦР анализа выявили экспрессию маркеров фолликулогенеза: Lef1, Pcadherin, кератинов 75, 35, 32 и трихогиалина. Мы не обнаружили признаков дальнейших морфогенетических процессов, следовательно, полученная модель требовала модернизации. Индуцирующие способности клеток ДП в культуре постепенно снижаются, ввиду изъятия из стволовой ниши. Снижение индуцирующих способностей приводило к формированию агрегатов меньшего размера и подавлению пролиферации. Реконструировали нишу клеток ВФ добавлением паракринных факторов и компонентов внеклеточного матрикса. Из них гиалуроновая кислота (ГК) увеличивала размер агрегатов и поддерживала пролиферативный уровень. Продолжительное культивирование агрегатов в геле ГК поддерживало жизнеспособность клеток на более долгий срок. Другим способом модернизации является использование менее дифференцированных клеток. Адаптировали протоколы получения клеток ДП и эпидермальных КЦ из плюрипотентных клеток человека. ДП-подобные клетки экспрессировали специфические маркеры и были способны вызывать фолликулогенез при трансплантации мышам с иммунодефицитом. Дифференцированные КЦ экспрессировали Р63, а также кератины 18, 5 и 14 на разных стадиях дифференцировки, что позволяет использовать КЦ, соответствующие фетальному или постнатальному. Полная реконструкция зачатков ВФ и других подобных органов (зубов, молочных желез и т.п.) к настоящему времени возможна только из клеток зародыша. Гели на базе ГК наиболее перспективны в этой области применения, к тому же

более соответствуют составу внеклеточного матрикса в фетальных тканях. Современные протоколы дифференцировки из плюрипотентных клеток оптимизируют исходные клеточные культуры и делают их более пригодными для получения тканеинженерных конструкций.

Финансирование исследования: *Грант РНФ № 16-14-00204.*

**Калинин А.А., Кутырев О.Е., Ермилов Е.В., Носенко Е.М., Батухтина Е.В., Крючкова О.В., Кириллова Е.Л., Пулин А.А., Еремин И.И.**

*ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации  
aakalinin73@list.ru*

### **ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ – ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Критическая ишемия (КИ) нижних конечностей является проявлением тяжелого поражения артерий нижних конечностей, которая характеризуется наличием болей покоя и трофическими изменениями. По данным некоторых авторов КИ в 30–60% случаев приводит к ампутации конечности. Проведение реконструктивной операции эффективно лишь в 40–70% случаях. В последние годы в мире появились научно-исследовательские работы по применению стволовых клеток в лечении различных патологических состояний, в том числе, и КИ. Однако использование стволовых клеток пока не нашло еще общего применения. Среди доступных постнатальных источников стволовых клеток, все большую популярность приобретает жировая ткань. Жировая ткань является наиболее удобным и богатым источником клеток с регенеративным потенциалом, число которых во много раз превосходит их количество в костном мозге и других тканях. В результате ферментативного расщепления жировой ткани может быть получен комплекс ядродержащих клеток – стромально-васкулярная фракция жировой ткани (СВФ). В настоящем клиническом исследовании представлен опыт использования СВФ у 6 больных с КИ нижних конечностей при атеросклеротическом поражении. Критерием включения пациентов в исследование была невозможность выполнения хирургической или эндоваскулярной реконструктивной операции. У 2 человек были боли покоя и у 4 – трофические изменения на нижней конечности. Всем больным проводилось комплексное обследование, включающее контрастную ангиографию, цветное дуплексное сканирование (ДС) артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) в динамике, транскутанного напряжения кислорода (ТсРО<sub>2</sub>) нижних конечностей в динамике, а также использовался вопросник по оценке качества жизни SF-36 и вопросник для оценки качества жизни больного с ишемией нижних конечностей PAQ (Peripheral Artery Questionnaire). Период наблюдения составил 12 мес. Побочных реакций после введения СВФ зарегистрировано не было. У одного пациента отмечено прогрессирование КИ в течение 1 мес. после включения в исследование, в связи с чем ему выполнена ампутация конечности на уровне бедра. Анализ прогрессирования ишемии у этого пациента показал изначально низкие пока-

затели ТсРО<sub>2</sub>, ЛПИ, а также наличие выраженных трофических нарушений на стопе. У остальных 5 пациентов конечности были сохранены. Боли покоя были купированы, имеющиеся трофические нарушения значительно уменьшились и у 2 пациентов полностью эпителизировались.

**ВЫВОДЫ.** Несмотря на небольшой опыт применения аутологичных стволовых клеток при КИ результат можно считать удовлетворительным. Достоверное увеличение показателей ЛПИ и ТсРО<sub>2</sub> в первые 6 мес., а также клиническая симптоматика свидетельствуют о положительном эффекте данного метода. В настоящее время исследование продолжается.

**Камалов А.А.<sup>1</sup>, Кирпатовский В.И.<sup>1</sup>, Камалов Д.М.<sup>1</sup>, Сагарадзе Г.Д.<sup>2</sup>, Макаревич О.А.<sup>2</sup>, Нимирицкий П.П.<sup>2</sup>, Осидак Е.О.<sup>4</sup>, Домогатский С.П.<sup>5</sup>, Акопян Ж.А.<sup>1,3</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ООО «Имтек»

<sup>5</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России  
Davidffm@mail.ru

### **ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ПЛАСТИКА МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ ПРЕПАРАТАМИ ИЗ КОЛЛАГЕНА I ТИПА**

В урологической практике нередки ситуации, когда необратимо повреждается один из участков мочевых путей и возникает необходимость замещения поврежденного сегмента другим материалом. Применяющиеся в современной медицине методы кишечной пластики мочевого пузыря сопряжены с высоким риском серьезных осложнений. В связи с этим изучается вопрос об альтернативных вариантах заместительной пластики мочевых путей с использованием как специально обработанных аллогенных и ксеногенных тканей, так и искусственно созданных заменителей стенки органа. Коллаген считается одним из наиболее перспективных материалов временного направляющего каркаса для регенерации тканей за счет постепенного замещения прилежащими собственными тканями организма, что выгодно отличает его от синтетических полимерных материалов, используемых в реконструктивной хирургии. Достоинствами коллагена, выделенного из тканей животных, являются отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, устойчивость к тканевым ферментам, регулируемая скорость лизиса в организме и способность образовывать комплексы с биологически активными веществами.

**ЦЕЛЬ.** Разработка методики заместительной пластики мочевых путей с использованием мембран из коллагена I типа, в том числе с включением в их состав кондиционированной среды, содержащей продукты секреции мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека.

**МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Экспериментальные исследования проведены на 48 Новозеландских кроликах-самцах массой 3–3,5 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария на рационе из специального комбикор-

ма с неограниченным доступом к воде. Проведено 6 серий экспериментов: 1-я серия — сравнительная оценка биосовместимости препаратов коллагена I типа, изготовленного из тканей крупного рогатого скота (бычий коллаген) и свиней, на модели их подшивания к наружной стенке мочевого пузыря ( $n = 12$ ); 2-я серия — сравнительная оценка способности к интеграции в ткань мочевого пузыря мембран, изготовленных из бычьего или свиного коллагена I типа, после замещения ими дефекта его стенки ( $n = 18$ ); 3-я серия — изучение возможности заместительной пластики уретры трубчатым препаратом коллагена I типа ( $n = 4$ ); 4-я серия — заместительная пластика мочевого пузыря мембранами из свиного коллагена I типа после его резекции ( $n = 5$ ); 5-я серия — заместительная пластика мочевого пузыря коллагеновыми мембранами, содержащими продукты секреции МСК жировой ткани человека, после его резекции ( $n = 5$ ); 6-я серия — резекция мочевого пузыря с его ушиванием ( $n = 4$ ). Из эксперимента животных выводили на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сут. после операции. Было показано, что коллагеновые мембраны, изготовленные из тканей свиньи, вызывают менее выраженную воспалительную реакцию в окружающих тканях и обладают большей биоинертностью и способностью инкорпорироваться в ткани мочевого пузыря по сравнению с мембранами из бычьего коллагена. При заместительной пластике уретры также происходит инкорпорация коллагенового протеза в собственные ткани. Имплантированная коллагеновая мембрана постепенно замещается тканью мочевого пузыря и уретры с практически полной эпителизацией и резорбцией коллагена через 1 мес. после цистопластики. Включение в состав мембран из свиного коллагена кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК человека, ускоряет регенерацию новообразованной стенки мочевого пузыря после его резекции. При этом происходит более выраженная реваascularизация новообразованной стенки мочевого пузыря с вращением в нее гладкомышечных клеток детрузора, тогда как при использовании мембран без среды коллагеновый имплантат замещается преимущественно соединительной тканью. Использование мембран с включением продуктов секреции МСК человека способствует более полноценному восстановлению функции реконструированного мочевого пузыря по сравнению с использованием мембран без включений и при простом ушивании резецированного мочевого пузыря. Таким образом, проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о целесообразности и перспективности использования препаратов коллагена I типа для заместительной пластики мочевых путей.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова, а также с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФ № 14-50-00029.*

**Калмыкова Н.В.<sup>1</sup>, Демьяненко И.А.<sup>1</sup>, Шишкина А.В.<sup>2</sup>, Хац Ю.С.<sup>1</sup>, Суслов А.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

<sup>2</sup> ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»

k.nina.v@mail.ru

### **СУСПЕНЗИОННАЯ ФОРМА ВОЛОКНИСТОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА: ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ В МОДЕЛИ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПОЛНОСЛОЙНОЙ КОЖНОЙ РАНЫ IN VIVO**

Способность децеллюляризованного внеклеточного матрикса (ВКМ) различных тканей к индукции пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, а также к активации процессов ремоделирования собственных тканей организма, обуславливает повышенный интерес к разработке биоматериалов на его основе с целью их применения в области регенеративной биомедицины. Целями настоящей работы являлись изготовление и испытание in vivo гидратированного раневого покрытия на основе очищенного волокнистого ВКМ дермы крупного рогатого скота, полученного методом щелочной децеллюляризации. Для получения децеллюляризованного ВКМ от кожи отделяли гиподерму и сосочковый слой дермы. Затем полученные лоскуты сетчатого слоя дермы инкубировали последовательно в растворах NaOH, NaOH и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> и отмывали дистиллированной водой до достижения pH смыва нейтральных значений. Удаление клеточных компонентов из ткани контролировали путем анализа гистологических срезов полученного матрикса, а также содержания в нем дцДНК. Полученные пласты очищенного волокнистого внеклеточного матрикса измельчали при помощи режущей мельницы PULVERISETTE (FRITSCH, Германия) до мелкодисперсного порошка. Измельченный матрикс подвергали радиационной стерилизации. После этого в асептических условиях при помощи гомогенизатора-диспергатора magicLAB (IKA, Германия) получали 3% суспензию частиц матрикса в стерильном 0,9% NaCl. Полученную суспензию дегазировали и асептически упаковывали в полипропиленовые шприцы. Для оценки воздействия изготовленного раневого покрытия на репаративные процессы в коже исследовали эффект суспензии в модели заживления полнослойной эксцизионной кожной раны у мышей. Эксперимент проводили на самцах мышей линии Balb/C. Всем животным под золепловым наркозом в межлопаточной области спины наносили полнослойную кожную рану. Раневой дефект мышей опытной группы полностью заполняли суспензией и покрывали сверху фиксирующей повязкой. В свою очередь раны мышей контрольной группы покрывали только фиксирующей повязкой. На 8-е сут. после проведения операций животных выводили из эксперимента и проводили забор кожных лоскутов в области раны. Полученные образцы тканей подвергали гистологическому и морфометрическому исследованию. Результаты исследования показали статистически достоверное увеличение площади грануляционной ткани и объемной плотности сосудов, а также снижение нейтрофильной инфильтрации ран у животных опытной группы по сравнению с контрольной. Полученные данные свидетельствуют об ускорении репаративных

процессов в коже под воздействием экспериментального раневого покрытия в форме суспензии измельченного волокнистого ВКМ.

**Каменская Э.В., Мухина И.В.**

ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия»  
Минздрава России  
kamelinnord@gmail.com

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНФРАКРАСНОГО (ИК) ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТУРУ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (НСК), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА**

При нейротрансплантации требуется большой объем клеток, который изначально выращивается из его малого количества. Их высокая численность может быть достигнута стимуляцией клеточной пролиферации. Сейчас активно используются физические способы воздействия, например, инфракрасное излучение. Тем не менее, механизм лазерной стимуляции остается еще неизученным, что затрудняет его путь в клинику.

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния инфракрасного излучения на нейральные стволовые клетки, выделенные из обонятельного эпителия человека, *in vitro*.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Аппарат лазерный ИППИТ РАН КРИК-4 (780 нм, 4,7 мВт/см<sup>2</sup>). Выделение и культивирование нейральных стволовых клеток обонятельного эпителия человека, иммуноцитохимическое фенотипирование, дистанционное стационарное облучение. Полученные данные обрабатывались в программах Microsoft Excel, ImageJ и SigmaPlot 11.0 (Anova). Объектом исследования являлись клетки ткани слизистой оболочки обонятельного эпителия 12 испытуемых (мужчин и женщин) в возрасте от 4 до 25 лет. В экспериментах по облучению ИК излучением использовались культуры нейральных стволовых клеток на следующий день после посадки, а также после 1 мес. культивирования. Исследовалось изменение пролиферации клеток облученных культур относительно контрольных. Подсчет клеток проводился на единицу площади в мм<sup>2</sup>. Оценка плотности монослоя визуально проводилась в течение 5 сут. культивирования. В ходе исследования было посчитано процентное содержание НСК, содержащихся в слизистой оболочке обонятельного эпителия человека. Исследована зависимость пролиферации контрольных и облученных НСК, выделенных из обонятельного эпителия человека, от времени их культивирования. Произведено иммуноцитохимическое фенотипирование клеток (Nestin, Sox2, GFAP, MAP2) монослойной культуры обонятельного эпителия после 14 дней, 1, 3 мес. ее культивирования в среде DMEM/F12 с 10%-содержанием FBS. Показано, что, начиная с первого по четвертый день облучения в монослойных культурах экспериментальных групп, которые были введены в эксперимент в первый день после посадки, наблюдается увеличение количества клеток относительно контрольных, что свидетельствует о стимулировании внутриклеточных процессов на первых этапах деления. При облучении культур после 1 мес. культивирования пролиферация клеток экспериментальных групп была ниже, чем у контрольных, и достоверно отличалась на 4-е сут. после начала облучения. Таким образом, инфракрасное излучение мощностью 329 мВт может изменять пролиферацию нейральных стволовых клеток как

в направлении активации, так и ингибирования, в зависимости от времени их культивирования.

**Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Петинати Н.А., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
kapranov.n@blood.ru

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА И ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 БЕТА НА ЭКСПРЕССИЮ HLA-ABC, HLA-DR И ICAM-1 НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) применяются в клинической практике в связи с их иммуносупрессивными свойствами. Однако не всегда применение МСК успешно, в связи с этим предпринимаются попытки усиления иммуномодулирующих свойств МСК с помощью различных цитокинов. В число этих цитокинов входят интерферон гамма (ИФН- $\gamma$ ) и интерлейкин 1 бета (ИЛ-1 $\beta$ ), оказывающие влияние на основные свойства МСК.

**ЦЕЛЬ.** Сравнить влияние ИФН- $\gamma$  и ИЛ-1 $\beta$  на иммуногенность МСК (экспрессия HLA-ABC и HLA-DR) и экспрессию молекул адгезии (CD54 /ICAM-1) на их поверхности.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включены МСК от 6 доноров костного мозга. МСК выделяли по стандартному протоколу. МСК обрабатывали 500 ед/мл ИФН- $\gamma$  ( $\gamma$ -МСК) и 4 пг/мл ИЛ-1 $\beta$  (ИЛ-МСК). 105 МСК ко-культивировали с 106 мононуклеарами крови донора. Часть мононуклеаров активировали с помощью фитогемагглютинаина (ФГА-лимфоциты). Экспрессию HLA-ABC, HLA-DR и CD54 на МСК без лимфоцитов, а также и с активированными и не активированными лимфоцитами исследовали через 1 и 4 сут. культивирования методом проточной цитометрии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Культивирование МСК с ФГА-лимфоцитами приводило к увеличению экспрессии HLA-ABC уже через сутки в 2 раза ( $p = 0,046$ ). Экспрессия HLA-ABC на  $\gamma$ -МСК увеличивалась по сравнению с контрольной только к 4 суткам в 2 раза ( $p = 0,026$ ). Через 4 сут. ко-культивирования с ФГА-лимфоцитами экспрессия HLA-ABC была в 1,3 раза меньше на ИЛ-МСК, чем на  $\gamma$ -МСК ( $p = 0,043$ ). Экспрессия HLA-DR на 1 сутки культивирования отсутствовала на МСК и ИЛ-МСК. Обработка ИФН- $\gamma$  приводила к увеличению экспрессии HLA-DR ( $p < 0,05$ ) на поверхности МСК уже через сутки культивирования и увеличивалась в 10 раз к 4 сут. Взаимодействие с неактивированными лимфоцитами приводило к незначительному изменению экспрессии HLA-DR на МСК и на ИЛ-МСК. Через сутки ко-культивирования экспрессия HLA-DR на ИЛ-МСК была ниже в 7 раз, чем на  $\gamma$ -МСК ( $p = 0,049$ ). Культивирование с ФГА-лимфоцитами привело к значительному увеличению экспрессии HLA-DR во всех группах МСК к четвертым суткам (в 10-50 раз). Экспрессия CD54 на поверхности МСК изменялась при обработке клеток ИФН- $\gamma$ : через сутки она выросла в 22 раза по сравнению с МСК ( $p < 0,0001$ ), аналогичные данные получены для  $\gamma$ -МСК, культивированных с неактивированными лимфоцитами. Вза-



имодействие с лимфоцитами приводило к увеличению экспрессии CD54 в 4 раза через сутки на МСК и ИЛ-МСК ( $p = 0,002$ ). После взаимодействия с активированными лимфоцитами экспрессия CD54 превышала в 51, 35 и 53 раза (для МСК, ИЛ-МСК и  $\gamma$ -МСК) уровень экспрессии CD54 на МСК (без лимфоцитов).

**ВЫВОДЫ.** Полученные результаты свидетельствуют об изменении свойств МСК как после их активации с помощью ИФН- $\gamma$ , так и после взаимодействия с лимфоцитами. Обработка ИЛ-1 $\beta$  не влияет на свойства культуры МСК, а при взаимодействии с лимфоцитами МСК остаются менее иммуногенными и демонстрируют меньшую экспрессию молекул клеточной адгезии ICAM-1. Успешность применения МСК в терапии может быть связана с балансом их адгезивных и иммуногенных свойств.

Финансирование исследования: РФФИ грант № 16-04-00189.

**Капустянов И.А.<sup>1</sup>, Пуцина Е.В.<sup>2</sup>,  
Вараксин А.А.<sup>2</sup>, Обухов Д.К.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет

<sup>2</sup> Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
ilyaak9772@gmail.com

**ИНДУКЦИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКОГО ТЕГМЕНТУМА МОЛОДИ КЕТЫ ONCORHYNCHUSKETA**

Мозг рыб обладает высокой интенсивностью морфогенетических процессов и пролиферативной активностью, поэтому он является привлекательным объектом для исследования нейрогенетических процессов. У эволюционно древних форм, таких как семейство лососёвых рыб (Salmonidae), наблюдается высокая концентрация недифференцированных элементов, как в матричных зонах мозга, так и в паренхиме. Нейрогенные процессы, происходящие в покрывке среднего мозга рыб, малоизучены, но могут представлять значительный интерес, так как включают в себя эволюционно древнюю область — медиальную зону ретикулярной формации. С помощью маркирования апоптотических клеток методом TUNEL, а также докрашивания прилежащих областей мозга метиловым зеленым исследовали ранний апоптотический ответ в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* после механической травмы. Уже через 2 часа после механического повреждения дорсального тегментума были выявлены интактные и TUNEL-позитивные клетки с различными морфологическими характеристиками, но при этом формирующие множество переходных форм, что свидетельствует в пользу гипотезы морфологического континуума. Апоптотический ответ, наблюдаемый в области повреждения, согласно полученным результатам характеризовался двухфазностью: в результате первой фазы наблюдалась элиминация мелких нейронов в области травмы, а во второй фазе апоптозу подвергались клетки микроглии, мигрирующие в зону травмы для утилизации апоптотических телец. В дорсальной медиальной ретикулярной формации (ДМРФ), прилежащей к гломерулярному ядру были обнаружены TUNEL-маркированные кластеры клеток, удаленные от места первичного повреждения. Вероятно, подобные вторичные очаги

апоптоза могли возникнуть в ходе персистентного морфогенеза, или же в результате распространения каскадной апоптотической реакции при повреждении проекционных нейронов. Наряду с участками вторичного апоптоза в ДМРФ нами были выявлены центры клеточной дифференцировки, а также крупные клетки, находящиеся в состоянии персистентного роста и имеющие высокие ядерно-цитоплазматические отношения. Таким образом, уже через 2 ч. после механической травмы в дорсальном тегментуме молodi кеты обнаруживаются выраженный апоптотический ответ, являющийся ответной реакцией на травму.

Финансирование исследования: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.04) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-1-6-116).

**Карагяур М.Н.<sup>1</sup>, Дыйканов Д.Т.<sup>2</sup>,  
Васильев П.А.<sup>2</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>2</sup>,  
Калинина Н.И.<sup>2</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова  
m.karagyaour@mail.ru

**НОВОЕ СЕКРЕТИРУЕМОЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ БЛОКИРОВКИ СВЯЗЫВАНИЯ IL-2 С ВЫСОКОАФФИННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, СОДЕРЖАЩИМ СУБЪЕДИНИЦУ IL-2RA (CD25)**

Пересадка органов нередко сопровождается отторжением, которое обусловлено несовпадением набора молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) донора с набором МНС реципиента. Вследствие этого Т-клетки реципиента воспринимают клетки трансплантата как «чужое», активируются и активно пролиферируют, что и приводит к отторжению трансплантата. Активация и пролиферация хелперных и цитотоксических Т-клеток зависит от рецепции цитокина IL-2, который сами Т-клетки и вырабатывают. Рецепция IL-2 осуществляется через тримерный рецептор, одна из субъединиц которого, IL-2R, отвечает за высокоаффинное связывание IL-2. Уровень IL-2R на поверхности активированных Т-клеток повышен для обеспечения сильного сигнала от IL-2, от которого зависит скорость деления и выживание пролиферирующих Т-клеток. Неудивительно, что уровень IL-2 резко возрастает и на ранних стадиях аутоиммунных заболеваний таких как сахарный диабет I-го типа, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит). На сегодняшний день существуют специфические антагонисты IL-2R — полноразмерные моноклональные блокирующие антитела. Препараты на их основе (базиликсимаб и даклизумаб) довольно успешно используют для профилактики отторжения трансплантата и лечения аутоиммунных лимфолиферативных заболеваний, однако они очень дороги (от 40 000 рублей за инъекцию) и, вследствие нестабильности, требуют многократного введения (минимум 2–3). Мы предлагаем более эффективный генотерапевтический подход, состоящий во введении в организм пациента генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках и секреции аналогов антител-блокаторов IL-2R, что позволит снизить стоимость лечения и увеличить продолжительность терапевтического эффекта после однократной инъекции. Цель дан-

ного проекта — дизайн и создание генетической конструкции, кодирующей рекомбинантное антитело, эффективно блокирующее взаимодействие IL-2 с IL-2R. На основе аминокислотной последовательности базиликсимаба мы создали его одноцепочечный аналог (ScFv) состоящий из фрагментов переменных доменов тяжелой и легкой цепей, соединенных между собой линкером. Мы полагаем, что создаваемое ScFv будет эффективно блокировать связывание IL-2 с IL-2R, а за счет меньшего размера легче проникать в ткани (~35 кДа против 143 кДа у базиликсимаба), обладая притом большей стабильностью. Показано, что созданная плазмидная конструкция pVax-antiCD25-scFv после трансфекции обеспечивает высокий уровень продукции antiCD25-scFv в среде культивирования. В настоящий момент проходит оценка эффективности нового антитела *in vitro*. В случае эффективности pVax-antiCD25-scFv можно будет применить как генно-терапевтический препарат или же в виде генномодифицированных клеток, продуцирующих antiCD25-scFv. Например, с помощью данной конструкции при необходимости можно усилить иммуносупрессивные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Предложенный подход можно использовать для создания доступных альтернатив дорогим терапевтическим антителам.

**Финансирование исследования:** *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00439), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Карагяур М.Н.<sup>1</sup>, Васильев П.А.<sup>2</sup>,  
Дыйканов Д.Т.<sup>2</sup>, Рысенкова К.Д.<sup>2</sup>,  
Сёмина Е.В.<sup>2</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1</sup>,  
Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>2</sup>, Александрюшкина Н.А.<sup>1</sup>,  
Шмакова А.А.<sup>2</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Институт регенеративной медицины,  
Медицинский научно-образовательный центр  
МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>2</sup> *Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
m.karagyaour@mail.ru*

### **ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ ГЕНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ С НЕСТАБИЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ**

Клеточные линии являются удобной модельной системой для выяснения роли отдельных белков в развитии и патогенезе различных заболеваний. Для установления роли конкретного белка с помощью генетических методов, как правило, изменяют уровень синтеза белка интереса путем, в частности, увеличения уровня экспрессии кодирующего белок гена, либо, наоборот, снижения экспрессии гена или полного выключения синтеза белка путем генетического нокаута. Прицельное выключение конкретных генов, например с использованием технологии CRISPR/Cas9, достаточно просто, если модифицируемые клетки являются гаплоидными или диплоидными. Однако большинство популярных клеточных линий (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a и т.д.) характеризуются нестабильным кариотипом, т.е. различным количеством хромосом и числом копий генов (от 1 до 5 копий на клетку). Множественные копии генов практически невозможно выключить за

один раунд генетической модификации, а разное количество генов в отдельных клетках делает популяции, полученные из них гетерогенными. Помимо этого, использование популяций клеток, происходящих из отдельных клонов, требует тщательной проверки на отсутствие нежелательных модификаций в геноме (т.н. off-target модификаций), поскольку все изменения в геноме, в том числе и нецелевые, будут содержать все клетки клона. В то же время, если клеточную популяцию получать, используя модификацию сразу большого числа клеток, минуя этап клонирования, влияние различной копийности генов и каждой конкретной нецелевой модификации генома не будет заметно из-за многочисленности таких клеток в общем пуле. Однако выключение экспрессии генов в большой (многочисленной) популяции клеток с помощью CRISPR/Cas9 — это нетривиальная задача. В результате одного раунда трансфекции линий клеток (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) плазмидой pX458, содержащей гены wtSpCas9, флуоресцентного маркера GFP и направляющей РНК (gRNA) к генам интереса, с последующим обогащением трансфицированных клеток по флуоресценции GFP, модификации подвержены лишь 20–50% аллелей. Целью данной работы было разработать эффективный и воспроизводимый протокол CRISPR/Cas9-опосредованной генной модификации популяции клеток, минуя этап клонирования. С помощью 2–3 циклов модификации с последующим обогащением по GFP нам удалось получить популяции клеток с выраженным (практически полным) подавлением экспрессии целевых генов. У полученных таким образом популяций клеток не наблюдали увеличения частоты нецелевой модификации ДНК. Получена новая информация о целесообразности применения различных вариантов системы модификации генома CRISPR/Cas9 в данном протоколе. Созданный протокол позволяет эффективно выключать гены в клеточных линиях с нестабильным кариотипом (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) или в клеточных линиях, клонирование которых затруднено (HepG2).

**Финансирование исследования:** *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Карагяур М.Н.<sup>1</sup>, Стамбольский Д.В.<sup>1</sup>,  
Балабаньян В.Ю.<sup>1</sup>, Климович П.С.<sup>2</sup>,  
Ростовцева А.И.<sup>2</sup>, Сёмина Е.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Институт регенеративной медицины,  
Медицинский научно-образовательный центр  
МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>2</sup> *Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
m.karagyaour@mail.ru*

### **РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕИННЕРВАЦИИ**

Травмы периферических нервов являются одной из значимых причин инвалидизации. Проблема неэффективной посттравматической реиннервации

в большинстве случаев обусловлена гибелью поврежденных нейронов и медленным восстановлением нервных волокон по причине непродолжительной экспрессии нейротрофических факторов после травмы. В связи с этим актуальным является создание новых высокоэффективных препаратов, способных поддерживать выживание поврежденных нейронов и стимулировать рост нейритов на фоне снижающейся эндогенной продукции нейротрофических факторов. Ранее нами было показано, что генная и клеточная терапия способствуют лучшему восстановлению поврежденного нерва. Использование для трансплантации как аутологичных, так и аллогенных клеток сопряжено со значительными трудностями, поэтому на текущем этапе развития регенеративной медицины генная терапия травмированных нервных волокон представляется более безопасной и перспективной. Ранее нами уже было исследовано влияние генно-терапевтического препарата, содержащего ген мозгового нейротрофического фактора (BDNF), на восстановление поврежденных нервных волокон *in vivo*. Однако в ходе выполнения работы было выявлено несколько недостатков этого препарата и способов его введения, и, создавая генно-терапевтический препарат нового поколения, мы исправили обнаруженные недостатки. В результате нами был создан невирусный вектор, в последовательности которого содержатся кДНК двух факторов: BDNF, который стимулирует выживание поврежденных нервных клеток и рост нейритов и активатор плазминогена урокиназного типа, или урокиназу (uPA), которая способствует очищению области травмы от фибрина, прорастанию нейритов, а также активирован BDNF и ряд других резидентных факторов роста. Введение в генетическую конструкцию кДНК uPA позволяет расширить спектр терапевтической активности данного препарата. В составе плазмиды кДНК BDNF и uPA разделены регуляторным участком IRES, что способствует сокращению размера генетической конструкции и обеспечивает подходящую экспрессию продуцируемых белков (BDNF:uPA  $\approx$ 10:1). В результате модификации регуляторных областей плазмиды нам удалось добиться лучшего проникновения полученной плазмиды в ядра миоцитов и большей продукции uPA и BDNF (более чем на 30%). Также был изменен и режим внутримышечного введения препарата: однократные инъекции заменены 4-кратным введением, а внутримышечное введение по типу гидродинамического удара было заменено обкалыванием денервированной мышцы. Такие изменения режима введения способствуют более длительному синтезу белков BDNF и uPA в денервированной мышце. Предварительные данные показали способность препарата стимулировать восстановление поврежденного нерва *in vivo*. В данный момент препарат проходит расширенное исследование специфической активности на модели травмы периферического нерва у мышей. Полученные результаты будут представлены на «III Национальном конгрессе по регенеративной медицине».

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФИ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Каралкин П.А.<sup>1</sup>, Свиридова И.К.<sup>1</sup>,  
Кирсанова В.А.<sup>1</sup>, Ахмедова С.А.<sup>1</sup>,  
Кувшинова Е.А.<sup>1</sup>, Комлев В.С.<sup>2</sup>,  
Сергеева Н.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России*

<sup>2</sup> *Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН*

pkaralkin@gmail.com

### **ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ 3D ПЕЧАТИ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ АНТИБИОТИКАМИ ИЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**

Восстановление объемных дефектов костной ткани является актуальной медицинской проблемой. При этом для реконструкции дефектов сложной формы часто необходимы индивидуальные имплантаты с заданной геометрией, структурой и пористостью. Одним из перспективных вариантов решения данной задачи является метод 3D печати биосовместимыми композиционными материалами. Целью данной работы являлась разработка подхода к созданию трехмерных конструктов с антибактериальной или противоопухолевой активностью в целях лечения костных патологий, осложненных инфекционными или опухолевыми процессами. Прототипирование трехмерных конструктов осуществляли методом экструзионной 3D печати гидрогелем на основе альгината натрия, желатина и гранул октакальциевого фосфата. Различные концентрации антибиотика ванкомицина или противоопухолевого препарата доксорубицина вносили в качестве дополнительного компонента на этапе приготовления гидрогелей для печати. Физические испытания конструктов включали оценку их микроструктуры и пористости посредством электронной микроскопии, ИК-спектроскопии, а также исследование механической прочности на сжатие и растяжение. Изучение кинетики выхода в модельных жидкостях организма показало интенсивное высвобождение препаратов из функционализированных конструктов в течение первых часов с последующим замедлением и выходом на плато к концу 3-х сут. В экспериментах *in vitro* посредством диско-диффузионного метода было установлено, что конструкты с ванкомицином проявляли выраженную антибактериальную активность в отношении патогенного штамма *Staphylococcus aureus*. В экспериментах *in vivo* на модели инфицированной *S. aureus* кожной раны крыс было продемонстрировано бактерицидное действие конструктов с ванкомицином, выразившееся в снижении интенсивности воспалительных процессов в послеоперационном периоде, а также в ускорении сроков заживления ран по сравнению с контрольной группой. В экспериментах *in vitro* были показаны выраженные цитостатические эффекты конструктов с доксорубицином в отношении клеточных линий рака молочной железы MCF-7 и Ca-755. При оценке специфической противоопухолевой активности *in vivo* установлено, что прививка мышам C57BL6 клеток Ca-755, предварительно обработанных доксорубицином из конструктов, приводила к низкому выходу и выраженному торможению роста опухолей. Средняя продолжительность жизни животных-опухоленосителей составляла 30 сут. в контроле и зна-

чительно превышала 3 мес. в экспериментальных группах. Изучение биосовместимости в подкожных тестах на мышах BDF1 и остеопластических свойств в модельных дефектах большеберцовой кости крыс Wistar показало отсутствие негативных эффектов со стороны ванкомицина в составе напечатанных конструкций и развитие умеренных признаков асептического воспаления в случае низких концентраций доксорибуцина. Таким образом, нами был разработан способ получения и последующей оценки персонализированных имплантатов, обладающих остеокондуктивными свойствами и антибактериальной или противовоспалительной активностью.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки (соглашение № 14.604.21.0132 от 21 октября 2014 г. ID:RFMEFI60414X0132).*

**Карпович В.Б.<sup>1,2</sup>, Нащекина Ю.А.<sup>2</sup>,  
Никонов П.О.<sup>2</sup>, Юдинцева Н.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова  
<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН  
kviccy@gmail.com

#### **РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНОГО СКАФФОЛДА И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Главной причиной инвалидизации и смертности населения в развитых странах мира, по данным ВОЗ, являются заболевания сердечно-сосудистой системы. При этом ишемия органов и тканей — главный патофизиологический механизм. Основным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов, являются шунтирующие операции. В качестве шунтов используют аутовены или аутоартерии. Однако при отсутствии собственных необходимых вен или артерий в результате проведения повторных операций или сопутствующей патологии сосудов в 30% случаев приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых протезов. Несмотря на экономическую доступность и удобство в применении, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неоинтимы или тромбообразования. Таким образом, существует острая необходимость разработки альтернативных протезов малого диаметра (< 6 мм).

**ЦЕЛЬ.** Создание искусственного биодеградируемого сосуда малого диаметра в условиях *in vitro*, заселенного мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В качестве материала для создания сосуда использовался полимер молочной кислоты — поли L,L-лактид, который обладает рядом свойств, необходимых для использования в регенеративной медицине: отсутствие токсичности, механическая прочность, биодеградация и др. Было приготовлено два варианта каркасов с различной толщиной стенки. В приготовленные сосуды вносили суспензию МСК. В условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора сосуды оставляли на 3 ч. с целью создания условий для максимальной адгезии клеток, затем добавляли питательную среду (статический способ посева кле-

ток). Подобную процедуру повторяли 3-кратно. После 7 дней культивирования с помощью криотома были сделаны криосрезы сосудов толщиной в 15–20 мкм и выполнена оценка присутствия и состояния клеток, окрашенных DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), с помощью конфокального микроскопа (LeicaTCSSP5).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.** В обоих исследуемых вариантах клетки адгезировали на стенки сосудов и образовывали плотный монослой. В настоящее время проводятся исследования по оценке физико-механических свойств приготовленных сосудов, а также разработка динамического способа заселения клеток и последующая имплантация наиболее оптимального варианта сосуда на модели лабораторных животных (крысы).

Финансирование исследования: *Грант РФ № 14-50-00068.*

**Касымов В.А., Доминова И.Н., Готовко О.В.**

Балтийский федеральный университет  
им. И. Канта  
vit.kasymov@gmail.com

#### **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ И ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОГО КОНТРОЛЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЛИОМНЫХ ОПУХОЛЕЙ: К НОВЫМ ПОДХОДАМ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ.**

Глиомы являются одними из самых опасных опухолей и, как правило, с довольно короткими периодами выживания пациента: менее 15 мес. после первоначального диагноза. Данные опухоли могут обладать различной степенью злокачественности и встречаются наиболее часто по сравнению с другими типами — примерно 30% всех случаев возникновения опухолей ЦНС и 80% всех злокачественных опухолей головного мозга. Стандартным подходом к лечению опухолей головного мозга является уменьшение опухоли в максимально возможной степени с помощью хирургии, лучевой терапии и химиотерапии. Однако, все эти подходы в большинстве случаев неэффективны. Инновационным подходом к терапии низкодифференцированных глиом является применение онколитических вирусов (ОВ). Генная терапия онкологических заболеваний предполагает доставку генов в клетки-мишени. Но ни ДНК, ни РНК не могут быть использованы в «голом виде» для достижения этой цели. Поэтому для доставки генов в эукариотические клетки, с начала 1980-х гг. разрабатываются векторные генетические конструкции на основе вирусов. Доклинические исследования на культурах опухолевых клеток и на животных с экспериментальными опухолями человека (включая экспериментальные глиомы) демонстрируют очень высокий терапевтический потенциал ОВ, превосходящий все существующие клинико-экспериментальные методы терапии. Малая вероятность формирования внутривенной резистентности в опухолевых клетках к ОВ и отсутствие значительных побочных эффектов даже при высоких дозах системного введения, делает ОВ особо привлекательными для генно-инженерной разработки улучшенных вариантов с высокой терапевтической активностью (Fukuhashi H., et. al. 2016). Первый лабораторный вирус для онколитической терапии был создан на основе Herpes simplex virus (HSV)

в 1991 г. Martuza et al. В настоящее время известны более 20 потенциальных ОВ более чем из 10 различных вирусных семейств. В фазе клинических испытаний находятся ОВ, созданные на основе вирусов HSV, AdV, NDV, H1, MV и PV (Баклаушев В.П., и др. 2016). В рамках этого направления активно разрабатываются новые способы лечения, основанные на доставке и экспрессии терапевтических генов, которые могут привести к гибели опухолевых клеток, ингибировать сосудобразование в опухоли или активировать эффективный иммунный ответ против глиом. Наиболее исследованными с точки зрения генетики системами транспортировки генетической информации в клетку являются вирусные векторы. На основе аденоассоциированных и лентивирусных векторов возможно создать генетические конструкции для специфической доставки генетического материала в клетки строго определенного типа глиом. Это позволит дистанционно и прецизионно активировать или ингибировать определенные внутриклеточные сигнальные каскады для подавления пролиферативной функции глиомных клеток, экспрессировать флуоресцентные белки для четкого разделения пораженной и здоровой ткани, что позволит вывести на новый уровень диагностику и лечение глиомных опухолей.

Финансирование исследования: *Поддержано Министерством образования и науки РФ (соглашение 14.575.21.0036, УИН RFMEFI57514X0036).*

#### **Кашапова И.С.<sup>1</sup>, Косовский Г.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева  
i-kashapova@rambler.ru

#### **ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА АДГЕЗИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Адгезионные взаимодействия являются регулятором жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Существуют два основных типа клеточной адгезии: клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ — зона трансмиссии, передачи сигналов от регуляторных систем организма к клеткам. Был проведен ряд экспериментов для определения уровня пролиферативной активности первичных популяций мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга (КМ) крысы с различным уровнем адгезии к желатину и фибронектину с целью выявления возможных различий. Клетки выделяли из костного мозга взрослых животных по методу Г.Ю. Косовского [1]. МСК КМ крысы первого пассажа в концентрации 200 000 кл/мл среды DMEM с глутамином (ПанЭко, Россия) с содержанием 10% FBS (HyClone, США) и 100-кратно разбавленного раствора антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США) высевали на чашки Петри, покрытые желатином или фибронектином для инкубирования в условиях 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере и температуре +37°C в течение 10 мин., после чего отбирали среду с не прикрепившимися за это время клетками в чашки Петри с желатином и фибронектином для последующего инкубирования в тех же условиях на протяжении 20 мин. По истечению 20 мин. не адгезировавшие за этот временной промежуток МСК также

переносили в соответствующие новые чашки Петри с покрытием соответствующими белками внеклеточного матрикса и оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе еще на 30 мин. Далее, отобранные популяции культивировали в течение 48 ч. в стандартных условиях. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. Время удвоения клеточных популяций определяли по формуле:

$$td = (2 \cdot \Delta T \cdot X_0) / X,$$

где:  $\Delta T$  — время эксперимента,  $X_0$  — исходная концентрация клеток,  $X$  — концентрация клеток через время  $T$ .

Из полученных результатов следует, что к желатину за 10 мин. адгезируется 15% МСК КМ крысы, при этом слабо проявляющих пролиферативные свойства ( $td = 72,6$  ч.), тем временем, как клетки, адгезирующиеся к желатину за 30 и 60 мин. (50% прикрепившихся МСК и 35% соответственно), обладают наивысшей скоростью пролиферации ( $td = 45,4$  ч.). При культивировании МСК КМ крысы на фибронектине, адгезирующихся за 10 и 60 мин. (40% и 15% соответственно), среднее время удвоения популяции составляет 58,8 ч., в то время, как клетки, прикрепляющиеся за 30 мин. (45%), обладают низким пролиферативным потенциалом ( $td = 70,1$  ч.). Таким образом, показано, что скорость пролиферации первичных популяций МСК КМ крысы связана с адгезивными свойствами, на который также влияет используемый субстрат адгезии.

#### *Литература:*

1. Косовский Г.Ю. Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных. Российская академия сельскохозяйственных наук, отделение ветеринарной медицины, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. М., 2009, 20 с.

Финансирование исследования: *Пункт программы ФНИ государственных академий наук на 2013-2020 годы и наименование направления исследования «Биоинженерные методы, технологии получения трансгенных животных, птиц, рыб и насекомых с заданными свойствами» «Разработать методы имитации гистотипической архитектоники с использованием приемов направленной дифференцировки клеточных популяций с заданными свойствами, в условиях in vitro» (№ 0584-2014-0005).*

#### **Квачева З.Б.<sup>1</sup>, Василевич И.Б.<sup>1</sup>, Полешко А.Г.<sup>1</sup>, Пинчук С.В.<sup>1</sup>, Чекина А.Ю.<sup>2</sup>, Марченко Л.Н.<sup>2</sup>, Волотовский И.Д.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии» НАН Беларуси

<sup>2</sup> Белорусский государственный медицинский университет  
kvachzb@tut.by

#### **ОПТИМИЗАЦИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МОНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА, КАК БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, С ЦЕЛЬЮ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ**

В настоящее время актуальной проблемой в офтальмологии является лечение заболеваний роговицы глаза, для чего требуется выполнение реконструктивных вмешательств с использованием донорских тканей. Высокая частота отторжения трансплантатов побуждает к поиску альтернативных методов лече-

ния. В последние годы большой интерес вызывают специализированные стволовые клетки, локализованные в ткани лимба и мезенхимальные стволовые клетки (МСК), находящиеся в окружающих глаз тканях. Экспериментальные доклинические и клинические исследования показали их эффективность в клеточной терапии повреждений роговицы глаза. В настоящее время описан ряд методик приготовления культур клеток глаза, отличающихся способами их выделения и условиями культивирования. Целью исследования явилась отработка технологии выделения и накопления *in vitro* биомассы стволовых клеток глаза, используемой для приготовления биомедицинского клеточного продукта и его применения для регенерации роговицы. На первом этапе исследований проведено определение оптимальных условий приготовления первичных монослойных культур стволовых клеток из биопсийных образцов лимба и жировой ткани орбиты глаза (ЖТ ОГ) пациентов и проведена сравнительная оценка роста клеток на ростовых средах различного состава. Критерием оценки жизнеспособности клеток на этапе получения первичной культуры служила эффективность колониеобразования, а на последующих пассажах — время удвоения клеточной популяции с сохранением эпителиоподобной (в случае клеток лимба) или фибробластоподобной морфологии — в случае клеток ЖТ ОГ. В качестве способа культивирования клеток использовали метод эксплантов. Миграция пролиферативно-активных клеток из эксплантов являлась: из ткани лимба на 3–5 сут, а из ЖТ ОГ — на 5–7 сут. Для приготовления культур стволовых клеток лимба (СКЛ) была выбрана среда DMEM/F12 с добавлением эпидермального фактора роста (ЭФР) и 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС). Установлено, что при разных концентрациях ЭФР (5–10 нг/мл) наблюдается различное время удвоения СКЛ (от 48 до 56 ч.). Способность СКЛ формировать колонии в зависимости от используемой концентрации ЭФР меняется в 1,7 раза. Популяция культивированных клеток ткани лимба была представлена стволовыми клетками и клетками предшественниками эпителия (нестин+, цитокератин — 14+, 16+, 19+). Для культивирования клеток из ЖТ ОГ использовали среду DMEM с 10% ЭТС. Популяция клеток ЖТ ОГ была представлена преимущественно МСК (CD44+/CD73+/CD90+/CD105+/CD34-/CD45-). Выделение стволовых и прогениторных клеток глаза из небольшого объема биопсийного материала глаза и наработка их биомассы сопряжена с определенными сложностями. Решение задачи определяют: метод эксплантов, состав ростовой среды, обеспечивающие жизнеспособность клеток и формирование крупных колоний эпителиоподобных (ткань лимба) или фибробластоподобных (ЖТ ОГ) клеток.

**Кизилова Е.А.<sup>1,2</sup>, Валетдинова К.Р.<sup>1</sup>,  
Захарова И.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

pinus@bionet.nsc.ru

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ, ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ ЭСК И ИПСК ЧЕЛОВЕКА (ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ТЕРАТОМНОГО ТЕСТА)**

Формирование экспериментальных опухолей («тератомный тест») до сих пор является единственным способом проверки *in vivo* плюрипотентности новых линий ЭСК и ИПСК человека. В данном исследовании выполнен сравнительный анализ 47 экспериментальных опухолей, которые были получены в результате тератомного теста, проведенного для ИПСК (5 линий, 38 автономных опухолей) и ЭСК (2 линии, 9 автономных опухолей) человека. Все опухоли получены по стандартному протоколу, в мышцах линии SCID, на фоне генетически-обусловленного врожденного иммунодефицита, методом глубокой внутримышечной (левая голень) или подкожной (область загривка) инъекции суспензии стволовых клеток. Три линии ИПСК (iSMA6L, m3SMA6 и iSMA37) сформировали опухоли вне зависимости от места инъекции. Две линии ИПСК (iSMA40 и m34Sk10) дали опухоли только при подкожной инъекции. Анализ макро-морфологии опухолей показал, что при подкожных инъекциях СК формируются только компактные инкапсулированные формы и достоверно чаще образуются кластеры пространственно разделенных автономных опухолевых узлов (до 4 шт). Внутримышечные опухоли более вариабельны по своей макроструктуре и морфологии. Они не имели капсулы и глубоко инвазировали в подлежащие ткани опорно-двигательной системы. Гистологический анализ показал, что распределение опухолей по разнообразию диагностических морфотипов имеет выраженную линейную специфику. Разнообразные дериваты зародышевых листков встречаются во всех ИПСК- и ЭСК-происходящих опухолях. Только опухоли, полученные подкожной инъекцией суспензии клеток линии m34Sk10, не являются тератомами. Это инкапсулированные доброкачественные липомы с редкими фиброзными тяжами. В данном эксперименте выявлен ряд специфических признаков, по которым ЭСК и ИПСК-происходящие опухоли достоверно отличаются. 1. В ЭСК-происходящих опухолях обнаружено меньше основных диагностических клеточных морфотипов, иллюстрирующих спектр дифференцировки зародышевых листков. Так опухоли, происходящие из ЭСК линии NuESF9-GFP, оказались самыми бедными по спектру дифференцировки. Опухоли, происходящие из ИПСК линии iSMA40, — самыми богатыми (среднее число диагностических морфотипов — 6+0,7 и 13+0,6 соответственно). 2. В ИПСК-происходящих опухолях часто встречаются обширные участки злокачественной природы. Среднее число злокачественных морфотипов, диагностируемое по образцам ИПСК- и ЭСК-происходящих опухолей, составляет 3+0,6 и 0,2+0,2 соответственно. 3. В ЭСК-происходящих опухолях практически полностью отсутствуют трофобластические производные. В ИПСК-происходящих

опухолях число диагностируемых экстраэмбриональных морфотипов колеблется от 2 до 5. 4. Многофакторный статистический анализ (МШ, МГК и ДА), проведенный по матрице из 83 признаков и 135 независимых образцов, подтвердил достаточно сильные различия ЭСК- и ИПСК-происходящих опухолей в пространстве первых трех координат.

Финансирование исследования: *Бюджетный проект № VI.60.1.2 «Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки. Экспериментальное использование клеточных технологий для воспроизводства и коррекции патологических состояний».*

**Корель А.В., Астахова Н.М., Щелкунова Е.И., Кирилова И.А.**

*ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»  
Минздрава России  
Ikirilova@niito.ru*

### **ИЗУЧЕНИЕ MORFO-FУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК ОСТЕОГЕННОГО РЯДА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ BIOMЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

В контексте современных подходов к стратегии развития регенеративной медицины разработка биомедицинских клеточных продуктов является актуальной. Разработка клеточных продуктов подразумевает изучение базовых характеристик клеток, входящих в данный продукт. Для этого в ходе настоящего исследования были изучены базовые характеристики клеток остеогенного ряда, такие как: адгезия, морфометрические особенности, пролиферативный потенциал (митотический индекс). Объектом исследования служили остеобласты, выделенные из фрагментов губчатой ткани резецированной головки бедренной кости человека. Во всех экспериментах были использованы клетки между пятым и пятнадцатым пассажем. В ходе исследования было установлено, что дифференцировку остеобластов *in vitro* можно характеризовать тремя стадиями: а) пролиферация клеток, б) созревание межклеточного матрикса, в) минерализация межклеточного матрикса. На протяжении всех стадий остеобласты экспрессируют специфические белки, которые являются маркерами определенной стадии дифференцировки данного вида клеток. Данные белки могут быть выявлены методом иммуногистохимического окрашивания. Фермент щелочной фосфатазы определяется уже на стадии пролиферации клеток и достигает максимальной экспрессии при созревании межклеточного матрикса. Клетки окрашивались от слабо голубоватого до темно-фиолетового цветов в зависимости от интенсивности экспрессии фермента щелочной фосфатазы. Остеобласты на стадии минерализации продуцировали многочисленные кальцификаты *in vitro*. Морфометрический анализ показал, что среднее значение диаметра остеогенных клеток составляло 17,37  $\mu\text{m}$ , в популяции данного типа клеток наблюдался разброс значений от 9,33  $\mu\text{m}$  до 29,91  $\mu\text{m}$ . Максимальный размер остеогенных клеток в дифференцированном виде (до 30  $\mu\text{m}$ ). Полученные результаты указывают на то, что необходимо учитывать максимальные размеры клеток при выборе материалов для создания тканеинженерных конструкций (скаффолдов с клетками). Предпочтительнее использовать образцы с размером пор от 250  $\mu\text{m}$

и более. В результате исследования двигательной и пролиферативной активности клеток остеобластического ряда на аппарате Cell-IQ было установлено, что для первичных клеток остеобластического ряда значение митотического индекса составило 4,64%, что, по нашему мнению, свидетельствует об активной пролиферации клеток. Удалось оценить среднюю скорость движения остеобластов. Значение подвижности клеток составило 49 пикселей/час (12964,42 мкм/час), среднее значение длины пройденного пути для остеобластов 2118 пикселей (560380,44 мкм за 43 ч. или 56 см). Таким образом, в ходе данного исследования были определены гистохимические маркеры для подтверждения остеогенного статуса клеток. Впервые были оценены такие параметры как: морфометрические особенности, пролиферативный потенциал (митотический индекс).

Финансирование исследования: *Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)».*

**Киселева Е.В.<sup>1,2</sup>, Сысоева М.Ю.<sup>3</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>1,2</sup>, Батухтина Е.В.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии развития» РАН

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

<sup>3</sup> ООО «Международная клиника “Семья”»

<sup>4</sup> ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации  
evkiseleva@mail.ru

### **ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБСТВУЮЩИХ СОХРАНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ**

Дефекты хряща плохо поддаются лечению из-за ограниченной способности хрящевой ткани к регенерации. Определенные успехи в лечении дефектов хряща сустава получены с применением клеточных технологий, технологический процесс которых состоит из следующих этапов: получение биоптата ткани, выделение и размножение хондроцитов в условиях *in vitro*, последующая реимплантация в поражённый участок в виде суспензии клеток или трёхмерного хрящевого эквивалента. При стандартных условиях культивирования хондроциты быстро меняют свой фенотип и теряют способность синтезировать специфический внеклеточный матрикс. Повторная дифференцировка клеток возможна только в трехмерных условиях культивирования, например в агарозном геле. Подбор условий культивирования, препятствующих дедифференцировке хондроцитов и/или способствующих их редифференцировке (восстановлению хондрогенного фенотипа) — актуальная задача клеточных биологов. В настоящей работе проведены исследования влияния факторов роста (TGF- $\beta$ 1, FGF18, BMP13, IGF1, EGF, BMP2), гиалуроновой кислоты, а также влияние гипоксии (5% O<sub>2</sub>) и нормоксии (20% O<sub>2</sub>) на сохранение фенотипа хондроцитов человека, полученных из разных источников хрящевой ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Исследовали 7 культур хондроцитов, выделенных из биопсий хрящевой ткани

разной локализации (ушная раковина, перегородка носа, крыло носа, мечевидный отросток) от доноров разных возрастов. Для анализа фенотипических характеристик хондроцитов использовали иммуноцитохимический, биохимический методы, ПЦР в реальном времени.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Из всех исследованных факторов роста только TGF- $\beta$ 1 оказывал значительное влияние на все культуры хондроцитов, стимулируя экспрессию маркеров хондрогенеза, в меньшей степени маркеров остеогенеза, дедифференцировки и гипертрофических изменений хондроцитов. Исследованные ростовые факторы не обеспечивают полноценной редифференцировки хондроцитов, так как помимо экспрессии хондрогенных маркеров стимулируют экспрессию маркеров дедифференцировки, остеогенеза и гипертрофических изменений хондроцитов. Гиалуриновая кислота, использованная в работе, оказывала дозозависимое негативное влияние на сохранение фенотипа и пролиферативную активность хондроцитов, а также угнетала синтез гликозаминогликанов, коллагена (вне зависимости от уровня O<sub>2</sub>). Культивирование в условиях гипоксии (5% O<sub>2</sub>) стимулировало хондрогенную дифференцировку хондроцитов ранних сроков культивирования, но усиливало их дедифференцировку на поздних сроках культивирования. Показано увеличение синтеза гликозаминогликанов и общего коллагена, а также пролиферативной активности хондроцитов в условиях гипоксии. TGF- $\beta$ 1 в сочетании с гиалуриновой кислотой, а также в сочетании с гиалуриновой кислотой и BMP13 значительно стимулировал синтез гликозаминогликанов и коллагена в условиях гипоксии.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Длительному сохранению фенотипических маркеров хондроцитов *in vitro* способствует культивирование в условиях гипоксии (5% O<sub>2</sub>), в присутствии TGF- $\beta$ 1, гиалуриновой кислоты (1 мг/мл) и BMP13.

**Китаева К.В., Прудников Т.С., Гомзикова М.О., Тазетдинова Л.Г., Ризванов А.А., Соловьева В.В.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
olleth@mail.ru

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ CD14+ МОНОЦИТОВ СО СТРОМАЛЬНЫМИ И ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO**

Известно, что большинство опухолей активно взаимодействуют с моноцитами/макрофагами для создания микроокружения, которое способствует ангиогенезу и метастазированию опухоли, а также подавляет врожденный и адаптивный иммунный ответ. Однако многие аспекты активности данных клеток при онкологических процессах остаются невыясненными. Во время прогрессирования опухоли, циркулирующие моноциты и макрофаги активно привлекаются в опухоль, где они изменяют микроокружение опухоли для ускорения ее прогрессии. Макрофаги способны изменять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения, генерируемые стромальными и опухолевыми клетками. Исследование взаимодействия моноцитов с опухолевыми и стромальными клетками важно для разработки новых методов диагностики и лечения

онкологических заболеваний человека. В настоящей работе проанализировано взаимодействие CD14+ моноцитов человека с мезенхимными стромальными клетками (МСК) и опухолевыми клетками HeLa в ко-культуре *in vitro*.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** МСК были выделены из жировой ткани человека по стандартному протоколу путем ферментации жировой ткани 0,2% раствором коллагеназы краба. CD14+ моноциты получали путем магнитной сепарации из периферической крови здорового донора с использованием набора EasySepHumanCD14 PositiveSelectionKit (StemCellTechnologiesInc). Перед внесением в ко-культуру клетки окрашивали витальными флуоресцентными красителями: VybrantDiD (красный) для МСК, Dil (оранжевый) для HeLa и CMFDA (зеленый) для моноцитов. После 72 ч. совместного культивирования отдельные клеточные популяции разделяли путем трипсинизации и сортировки в зависимости от спектра флуоресценции и размера клеток на проточном цитофлуориметре FACS Aria III (BD Biosciences). Жизнеспособность клеточных популяций после сортировки анализировали MTS-тестом.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Цитофлуориметрический анализ отдельных клеточных популяций после 72 ч. совместного культивирования CD14+ моноцитов с МСК или клетками HeLa показал активный обмен мембранными компонентами между различными типами клеток. В ко-культуре CD14+ моноцитов с HeLa процент клеток со смешанным спектром флуоресценции составлял 38,5%, а в ко-культуре с МСК – 25,3%. MTS-тест показал значительное снижение жизнеспособности клеток HeLa после совместного культивирования с моноцитами (на 36% по сравнению с монокультурой). Интересно, что совместное культивирование CD14+ моноцитов с МСК повышало жизнеспособность стромальных клеток на 46% по сравнению с монокультурой. При этом отмечено снижение жизнеспособности CD14+ моноцитов после совместного культивирования с МСК (на 65% по сравнению с контролем). Таким образом, показана принципиальная возможность совместного культивирования CD14+ моноцитов со стромальными и опухолевыми клетками человека. Разработанная система может быть использована для исследования молекулярных и клеточных механизмов взаимодействия различных популяций опухолевого микроокружения *in vitro*.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60201 и программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*



**Людуп А.В.<sup>1</sup>, Тенчурин Т.Х.<sup>2</sup>, Шепелев А.Д.<sup>2</sup>,  
Клабуков И.Д.<sup>1</sup>, Мудряк Д.Л.<sup>1</sup>, Титов А.С.<sup>1</sup>,  
Балясин М.В.<sup>1</sup>, Ляшенко Ю.С.<sup>1</sup>, Чвалун С.Н.<sup>2</sup>,  
Дюжева Т.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Минздрава России

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

ilya.klabukov@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО РОСТОВЫМИ ФАКТОРАМИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО МАТРИКСА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК IN VITRO И СТИМУЛЯЦИЮ АНГИОГЕНЕЗА IN VIVO**

Обеспечение физиологически релевантного клеточного микроокружения является в настоящее время серьезной проблемой при создании каркасов и тканеинженерных конструкций на основе биосовместимых и биodeградируемых полимерных материалов. Функционализация материалов биологически активными соединениями применяется как один из способов индукции формирования кровеносных сосудов в зоне имплантации. В качестве таких соединений в основном применяются белковые ростовые факторы, но также могут быть использованы и терапевтические нуклеиновые кислоты.

**ЦЕЛЬ.** Изучить влияние модифицированных ростовыми факторами и нуклеиновыми кислотами биodeградируемых матриксов на пролиферацию клеток *in vitro* и стимуляцию ангиогенеза *in vivo*.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** С целью ангиогенной функционализации выполнялась модификация волокнистых матриксов из поликапролактона (ПКЛ), с использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP), эпидермального фактора роста (EGF) и препарата «Неоваскулген» (плазмида pCMV-VEGF165). Растворы белков и биологически активных соединений в фосфатном буфере вводили в состав прядильных растворов на основе хлороформа, содержащих 1% флюороника F-127. Оценивали способность способа модификации к включению биологически активных соединений в состав матрицы на примере GFP с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии. Изучали влияние инкорпорированного EGF в составе матрикса на пролиферацию *in vitro* линии MCF7 путем биосенсорного анализа клеточного индекса в режиме реального времени на клеточном анализаторе iCelligence (ACEA, США). Влияние функционализации биodeградируемого матрикса препаратом «Неоваскулген» на ангиогенез *in vivo* изучали путем его подкожной имплантации 24 крысам линии Вистар в область спины на сроки 16 и 33 сут.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Флуоресцентная конфокальная микроскопия показала возможность включения GFP в волокна из ПКЛ. Модифицированные EGF матриксы стимулировали пролиферацию культур эпителиальных клеток *in vitro*: средний клеточный индекс составил 465% против 160% в контроле. В исследовании *in vivo* матрикса, модифицированного препаратом «Неоваскулген», на 33 сут. отмечено увеличение плотности сосудов в зоне импланта в среднем на 41% по сравнению с контролем. Волокнистый матрикс из ПКЛ обладал низкой цитотоксичностью. Время полной биodeградации волокнистого матрикса из ПКЛ *in vivo* составило не более 60 сут.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Биологический эффект *in vivo* свидетельствует о возможности ангиогенной функ-

ционализации биосовместимых матриксов при их модификации нуклеиновокислотными молекулами.

Финансирование исследования: Настоящая работа была выполнена при поддержке соглашения о субсидии № 14.604.21.0133 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0133).

**Дюжева Т.Г.<sup>1</sup>, Платонова Л.В.<sup>1</sup>, Куимов А.Н.<sup>2</sup>,  
Людуп А.В.<sup>1</sup>, Клабуков И.Д.<sup>1</sup>, Мудряк Д.Л.<sup>1</sup>,  
Токарев М.В.<sup>1</sup>, Гальперин Э.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины,  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава  
России (Сеченовский Университет)

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им.

А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова  
ilya.klabukov@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ И РАСТУЩЕЙ ПЕЧЕНИ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ПЕЧЕНИ IN VIVO И ПРОЛИФЕРАЦИЮ ГЕПАТОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

В основе патогенеза функционального отказа печени при массивных поражениях лежит недостаточность механизмов репаративной регенерации печени. Ранее было показано, что экстракт из регенерирующей печени крыс способствовал восстановлению поврежденной печени (LaBrecque D.R., 1975). Мы предположили, что для восстановления поврежденной печени необходима совокупность активных ингредиентов.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Изучение пролиферативной и гепатопротекторной функции экстракта и его фракций, полученных по оригинальной методике из растущей печени модельных животных.

**МЕТОДЫ.** Экстракты из печени неонатального поросенка и печени крыс после ее 70% резекции получали по оригинальной методике, и были названы нами Hepatic Regeneration Set (HRS). Экстракт фракционировали на колонке с сорбентом ToyorearHW-50S. Действие экстрактов и полученных фракций оценивали на модели токсического повреждения печени мышей тиацетамидом (ТАА) по изменению активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови. В экстракте из мышинной печени определяли ферментативную активность танкиразы. Использовались культуры Huh7, NIH/3T3, HEK 293 и HeLa.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Активность АСТ и АЛТ у интактных животных составила 50 и 80 Е/л, соответственно, через 48 ч. после введения ТАА повышалась до  $2059 \pm 212$  и  $4280 \pm 440$  Е/л. У животных, которым помимо ТАА вводили HRS из регенерирующей печени крыс, активность АСТ составила  $924 \pm 148$  Е/л и АЛТ —  $1633 \pm 308$  Е/л, после введения HRS из печени неонатального поросенка —  $937 \pm 138$  Е/л и  $1710 \pm 237$  Е/л. Получены две активные фракции HRS, молекулярной массой 3–60 кДа (фракция 1) и 3–25 кДа (фракция 2а), с удельным индексом восстановления печени 52,1 и 22,6 %/мг (по АСТ) и 45,7 и 17,7%/мг (по АЛТ), по сравнению с удельным индексом восстановления печени экстрактом — 1,8 %/мг (по АСТ) и 2,2 %/мг (по АЛТ). Через 24 ч. после введения HRS активность танкиразы увеличивалась на  $95 \pm 28\%$  по сравнению с контролем. В отсутствие сыворотки (FBS) HRS способствовал росту культуры гепатоцитов линии Huh7 и стабилизировал первичную культуру гепатоцитов мыши, эффект являлся дозозависимым. На культуры других клеток экстракт не влиял.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Экстракты печени неонатального поросенка и регенерирующей печени крысы имеют идентичную гепатопротективную активность. Выделены активные фракции HRS с гепатопротекторным эффектом, в 8–29 раз превышающим эффект экстракта в целом. HRS усиливал активность фермента танкиразы, и в отсутствие FBS поддерживал клеточные культуры гепатоцитарного ряда.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-54-53090 ФГЕН\_а (2016-2017), а также государственного контракта Минобрнауки РФ № 16.740.11.0499 (2011-2012).*

**Климович П.С.<sup>1</sup>, Семина Е.В.<sup>2</sup>, Карагяур М.Н.<sup>1</sup>, Рысенкова К.Д.<sup>1</sup>, Рубина К.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России  
lex2050@mail.ru

### **РЕГЕНЕРАЦИЯ НЕРВОВ ЗАВИСИТ ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА С $\alpha 5\beta 1$ -ИНТЕГРИНАМИ**

Урокиназа (uPA) и её рецептор (uPAR) — ключевые компоненты системы фибринолиза. Взаимодействие uPAR с интегринами изменяет активность фокальных киназ (FAK), вызывает перестройку цитоскелета и активирует направленную клеточную миграцию. uPA активирует миграцию нейронов и стимулирует рост нейритов *in vitro* независимо от ее протеолитической активности, тогда как связывание uPA с uPAR обеспечивает взаимодействие с интегринами и приводит к фосфорилированию FAK. Мы предположили, что uPAR взаимодействует с  $\alpha 5\beta 1$ -интегринами при регенерации нерва. Для проверки нашей гипотезы мы использовали *in vivo* модель травматического пережатия нерва у мышей, лишенных uPA (uPA – / –), uPAR (uPAR – / –) и WT в качестве контроля. Оценка восстановления нервов показала, что через 14 дней амплитуда у uPA – / – мышей и WT была сходной, тогда как амплитуда у uPAR – / – значительно снижена. Латентный период у uPAR – / – через 7 дней был существенно выше, чем у uPA – / – и WT. Мы предположили, что именно uPAR, но не uPA играет важную роль во время регенерации нервов. Гистологический анализ поврежденных нервов показал резкое уменьшение количества аксонов у uPAR – / – по сравнению с WT и uPA – / – на 7 день после травмы. Сборка интегриновых адгезивных контактов и со-локализация  $\alpha 5\beta 1$ -интегринов с uPAR, а также экспрессия uPAR значительно возрастала в uPA – / – нервах по сравнению с WT. В клетках нейробластомы Neuro2a *in vitro*, гиперэкспрессирующих uPAR, в клеточной мембране экспрессировалось больше  $\alpha 5\beta 1$ -интегринов по сравнению с контролем. Однако уровень мРНК  $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в контрольных клетках и гиперэкспрессированный uPAR был аналогичным. При подавлении нативной экспрессии uPAR в клетках Neuro2a наблюдали противоположный эффект — снижение сборки интегринов и их со-локализации с uPAR на мембране. Таким образом мы обнаружили, что отсутствие uPAR, но не uPA, замедляет регенерацию нервов, а для восстановления нервов необходима совместная локализация uPAR и  $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. Это новое доказательство того, что при регенерации аксонов сборка адгези-

онных контактов в значительной степени регулируется uPAR, но не uPA, как было предложено ранее.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счёт средств Гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086).*

**Князев О.В.<sup>1</sup>, Фадеева Н.А.<sup>1</sup>, Каграманова А.В.<sup>1</sup>, Лищинская А.А.<sup>1</sup>, Коноплянников А.Г.<sup>2</sup>, Бабаян А.Ф.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗ г. Москвы

<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России  
oleg7@bk.ru

### **ЧАСТОТА РЕЦИДИВОВ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ И БОЛЕЗНЬЮ КРОНА, ПОЛУЧАЮЩИХ КЛЕТЧНУЮ ТЕРАПИЮ — 5 ЛЕТ НАБЛЮДЕНИЯ**

Многочисленными исследованиями установлено, что мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают высоким потенциалом дифференцировки, а также иммуносупрессивными свойствами. В настоящее время проводятся I-III фазы клинических исследований, оценивающих эффективность и безопасность МСК в лечении больных воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) — язвенным колитом (ЯК) и болезнью Крона (БК).

**ЦЕЛЬ.** Сравнить частоту рецидивов и продолжительность ремиссии в течение 5 лет наблюдения у больных с люминальной формой болезни Крона (БК) в форме колита и тотальным поражением язвенного колита (ЯК), получающих терапию мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Сравнили частоту рецидивов в группе больных с люминальной формой БК в форме колита (1 группа), с группой больных ЯК (тотальное поражение) (2 группа), получающих МСК. 1-я группа (БК) в возрасте от 22 до 56 лет (Me-28) (n = 24) получала культуру МСК по схеме (0–1–2 нед., затем каждые 26 нед.). 2-я группа больных (ЯК) (n = 26) в возрасте от 20 до 62 лет (Me-28) получала культуру МСК по аналогичной схеме. Оценку эффективности терапии по частоте рецидивов осуществляли через 12, 24, 36, 48 и 60 мес. от начала терапии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Среди больных 1-й группы рецидив заболевания в течение 12 мес. наблюдения произошел у 2/24 пациентов (8,3%), во 2-й группе рецидив заболевания произошел у 3/26 (11,5%) (ОР-0,72; 95% ДИ 0,13-3,96, p = 0,92). Через 24 мес. в группе больных (1-я группа), получающих МСК, рецидив заболевания произошел у 5/24 (20,8%), во 2-й группе больных рецидив заболевания у 7/26 (26,9%) (ОР-0,77; 95% ДИ 0,13-3,96, p = 0,92). Через 36 мес. в 1-й группе больных рецидив заболевания у 8/24 (33,3%), во 2-й группе рецидив у 14/26 (53,8%) (ОР-0,62; 95% ДИ 0,32-1,21, p = 0,24), Через 48 мес. в 1-й группе, получающих МСК, рецидив у 11/24 (45,8%), во 2-й группе рецидив у 18/26 (69,2%) (ОР-0,6; 95% ДИ 0,37-0,97, p = 0,048). Через 60 мес. в 1-й рецидив у 16/24 (66,6%), во 2-й группе рецидив у 22/26 (84,6%) (ОР-0,63; 95% ДИ 0,44-0,90, p = 0,013).

**ВЫВОДЫ.** Трансплантация МСК способствует поддержанию более длительной клинической

ремиссии у больных с люминальной формой болезни Крона по сравнению с группой больных, страдающих язвенным колитом.

Финансирование исследования: *Бюджетное финансирование НИР.*

**Князев О.В.<sup>1</sup>, Беляков Н.И.<sup>1</sup>,  
Каграманова А.В.<sup>1</sup>, Добролюбова Е.А.<sup>1</sup>,  
Конопляников А.Г.<sup>2</sup>, Парфенов А.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения Москвы*

<sup>2</sup> *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России*  
oleg7@bk.ru

### **ТЕРАПИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИАНАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА**

Перианальные свищи – наиболее распространенные и часто встречающиеся типы свищей при болезни Крона. Они с трудом поддаются лечению, ухудшают качество жизни больного и повышают риск резекции кишки. Несмотря на значительный эффект антицитокиновой терапии свищевой формы БК, лечение данной категории больных остается трудной задачей, с высоким риском развития рецидива БК. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие иммуномодулирующими свойствами и большим регенеративным потенциалом, в настоящее время также применяются для лечения свищевой БК и перианальных свищей иной этиологии.

**ЦЕЛЬ.** Сравнить эффективность комбинированной терапии (местное и системное введение) мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга, инфликсимаба (ИФЛ) и антибиотиками (АБ)/иммуносупрессорами (ИС) на частоту заживления простых перианальных свищей при болезни Крона (БК).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 36 больных БК с перианальными поражениями разделили на три группы в зависимости от метода терапии. Первая группа больных в возрасте от 19 до 58 лет (Me-29) (n = 12) получала культуру МСК системно по схеме и местно: по периметру свищевого хода осуществлено введение 40 млн МСК – 4 точки вкола по 1 мл физиологического раствора, содержащего 10 млн МСК. Затем через 4 и 8 недель повторно вводили по 40 млн МСК в область свища. Вторая группа больных БК (n = 10) в возрасте от 20 до 68 лет (Me-36), получала антицитокиновую терапию ИФЛ по схеме. Третья группа больных БК (n = 14) в возрасте от 20 до 62 лет (Me-28) получала антибиотики и ИС. В динамике оценивали закрытие наружного отверстия свища. Ано- и ректосигмоскопию осуществляли через 3, 6, 12 и 36 мес. от начала терапии. Результаты. Через 12 недель среди больных 1-й группы заживление простых свищей отмечено у 10/12 больных (83,3%), во 2-й группе заживление простых свищей у 8/10 (80,0%) (ОР-0,83; 95% ДИ 0,14-4,9, p = 0,72). В третьей группе – у 5/14 пациентов (35,7%) (ОР-0,26; 95% ДИ 0,07-0,97, p = 0,04 в сравнении с первой группой). Через 6 мес. в группе больных (1-я группа), получающих МСК, заживление простых свищей сохранялось у 8/12 (66,6%), во 2-й груп-

пе – у 7/10 (70,0%) (ОР-1,11; 95% ДИ 0,32-3,84; p = 0,76). В третьей группе – у 4/14 пациентов (28,6%) (ОР-0,47; 95% ДИ 0,2-1,11; p = 0,12 в сравнении с первой группой). Через 12 мес. в 1-й группе, получающих МСК, заживление простых свищей сохранялось у 7/12 (58,3%), во 2-й группе – у 6/10 (60,0%) (ОР-1,25; 95% ДИ 0,48-3,22; p = 0,69). В третьей группе – у 2/14 пациентов (14,3%) (ОР-0,49; 95% ДИ 0,24-0,98; p = 0,03 в сравнении с первой группой). Через 36 мес. среди больных 1-й группы закрытие свищей сохранялось у 5/12 больных (41,6%), во 2-й группе – у 5/10 (50,0%) (ОР-1,17; 95% ДИ 0,53-2,55; p = 0,96). В третьей группе – у 0/14 пациентов (0,0%) (ОР-0,58; 95% ДИ 0,36-0,94; p = 0,01 в сравнении с первой группой).

**ВЫВОД.** Комбинированная клеточная (местное и системное введение) и антицитокиновая терапия БК с перианальными поражениями достоверно способствует более частому и длительному закрытию простых свищей, по сравнению с антибиотиками/иммуносупрессорами.

Финансирование *Исследования: бюджетное финансирование НИР.*

**Князев О.В.<sup>1</sup>, Фадеева Н.А.<sup>1</sup>,  
Каграманова А.В.<sup>1</sup>, Болдырева О.Н.<sup>1</sup>,  
Конопляников А.Г.<sup>2</sup>, Парфенов А.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗ г. Москвы*

<sup>2</sup> *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России*  
oleg7@bk.ru

### **ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И АЗАТИОПРИНА НА КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ КРОНА**

Одним из новых перспективных методов лечения болезни Крона (БК) является биологическая терапия с применением мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга. В ряде случаев одновременно с МСК, больные получают сопутствующую иммуносупрессивную терапию. Установлено, что иммуномодулирующие препараты (азатиоприн, метотрексат, 6-меркаптопурин, инфликсимаб), независимо от концентрации, не влияют на жизнеспособность, дифференцировку, фенотип и способность МСК подавлять пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови. Однако исследования, проведенные Huang H.R. et al. продемонстрировали, что ИФЛ оказывал минимальное воздействие на пролиферацию МСК, апоптоз и их клеточный цикл, в то время как азатиоприн ингибировал пролиферацию клеток и индуцировал апоптоз МСК *in vitro*.

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния комбинированного применения МСК костного мозга и азатиоприна (АЗА) на клиническое течение БК.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 34 больных с люминальной формой БК разделили на две группы. Первая группа больных в возрасте от 19 до 58 лет (Me-29) (n = 15) получала противовоспалительную терапию с применением культуры МСК 2 млн/кг + АЗА 2 мг/кг. Вторая группа больных БК (n = 19) в возрасте от 23 до 60 лет (Me-31) получала МСК в соответствии с рекомендуемой схемой (без АЗА). Культура МСК

вводилась трижды в течение месяца с интервалом 1 нед. через 6 мес. с момента первого введения МСК. Исходный средний индекс активности болезни Крона (ИАБК) в первой группе составил  $337,6 \pm 17,1$  баллов, во второй —  $332,7 \pm 11,0$  баллов ( $p = 0,3$ ). Оценку эффективности терапии осуществляли через 12, 24 и 36 мес.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Через 12 мес. в первой группе больных БК рецидив произошел у 1 больного БК (6,6%), во второй — у 2 (10,5%) (ОР-0,63, 95% ДИ 0,06-6,34,  $p = 0,82$ ). Средний ИАБК в первой группе больных БК составил  $99,9 \pm 10,8$  баллов, во второй —  $100,6 \pm 12,1$  баллов ( $p = 0,8$ ). Через 24 мес. в первой группе больных рецидив БК произошел у 3 пациентов (20,0%), во второй — у 4 (21,05%) (ОР-0,95, 95% ДИ 0,25-3,61,  $p = 0,72$ ). Средний ИАБК в первой группе больных БК составил  $133,2 \pm 28,3$  баллов, во второй —  $120,8 \pm 15,5$  баллов ( $p = 0,2$ ). Через 36 мес. в первой группе больных БК рецидив произошел у 5 больных БК (33,3%), во второй — у 6 (31,6%) (ОР-1,06, 95% ДИ 0,4-2,8,  $p = 0,79$ ). Средний ИАБК в первой группе больных БК составил  $139,9 \pm 23,4$  баллов, во второй —  $141,7 \pm 20,8$  баллов ( $p = 0,9$ ).

**ВЫВОДЫ.** В течение трех лет наблюдения у пациентов, получавших одновременно МСК и АЗА и у пациентов, получавших только МСК, не было отмечено разницы в частоте рецидивов и активности БК.

Финансирование исследования: *Бюджетное финансирование НИР.*

**Коваленко В.Р.<sup>1,2,3,4</sup>, Вяткин Ю.В.<sup>5</sup>,  
Медведев С.П.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет

<sup>5</sup> ООО «АкадемДжин»

kov\_r@ngs.ru

#### **СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

Современная фармакология, основанная на рациональном дизайне потенциальных лекарственных соединений, требует создания модельных систем, предназначенных для поиска молекул-мишеней и тестирования препаратов. Болезнь Паркинсона является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, набор средств терапии которого сильно ограничен. Целью данной работы является создание клеточной платформы, предназначенной для выявления роли генов, других генетических элементов, а также взаимодействий макромолекул в патогенезе болезни Паркинсона. Такая платформа на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) предоставит возможность изучить роль и поведение различных генов в ходе дифференцировки стволовых клеток в направлении дофаминергических нейронов. Мы сможем «заглянуть в эмбриогенез» людей пожилого возраста и выяснить, существуют ли некие определенные предпосылки для нейродегенерации ещё на

том этапе, а также обнаружить, как меняется паттерн взаимодействия альфа-синуклеина и его партнеров на различном генетическом фоне. На настоящий момент получены образцы биоматериала от 60 человек: 50 пациентов и 10 условно здоровых. Проведено секвенирование клинического экзома ДНК (5300 генов) всех образцов. Данные секвенирования 30 пациентов уже прошли биформатический анализ и верификацию, с целью выявления SNP в генах, ассоциированных с БП (LRRK2, PINK1, ATR13A2, PLA2G6, VPS35, CDA, SNCA). Верификацию проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. Из периферической крови были выделены мононуклеары, которые впоследствии были репрограммированы к плюрипотентному состоянию. Получены линии ИПСК от одного из пациентов, несущего патогенную мутацию с.С1256Т в гене LRRK2. Для подтверждения плюрипотентного состояния проведены тесты: ОТ-ПЦР, окраска на щелочную фосфатазу, иммунофлуоресценция. Созданы все генетические конструкции, предназначенные для управляемой экспрессии белков SpCas9-HF1, AsCpf1 и альфа-синуклеина с FLAG-эпитопом. Планируется создание трансгенных линий ИПСК с этими конструкциями для разностороннего изучения патогенеза болезни Паркинсона.

Финансирование исследования: *Бюджетный проект.*

**Ковина М.В.<sup>1</sup>, Карнаузов А.В.<sup>2</sup>,  
Крашенинников М.Е.<sup>1</sup>, Ковин А.Л.<sup>3</sup>,  
Балясин М.В.<sup>1</sup>, Гажеев С.Т.<sup>4</sup>, Сергиевич Л.А.<sup>2</sup>,  
Карнаузова Е.В.<sup>2</sup>, Богданенко Е.В.<sup>5</sup>,  
Людуп А.В.<sup>1</sup>, Дюжева Т.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН

<sup>3</sup> Школа № 1354 г. Москва, Медицинский класс

<sup>4</sup> Школа № 192 г. Москва, Медицинский класс

<sup>5</sup> Институт общей патологии и патофизиологии gershi2001@yahoo.com

#### **НЕАБЛАТИВНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СИНГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА В ПОЗДНЕМ ВОЗРАСТЕ СУЩЕСТВЕННО УВЕЛИЧИВАЕТ МАКСИМАЛЬНУЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ**

Увеличение МПЖ (максимальная продолжительность жизни) — наиболее значимый индикатор воздействия на базовые механизмы старения, в частности, на возрастную убыль стволовых клеток. Недифференцированные СК (стволовые клетки) могут эффективно дифференцироваться в тот клеточный тип, к которому принадлежит их клеточное микроокружение. Это объясняет эффективность пересадки костного мозга (КМ) при исцелении не только болезней крови, но и таких системных заболеваний, как мукополисахаридоз, старческая тугоухость, буллезный эпидермолиз. Задачей настоящей работы было определить влияние на МПЖ трансплантации КМ, инициированной в возрасте, когда половина популяции уже умерла от старости. К этому возрасту содержание стволовых клеток в КМ значительно падает. В качестве доноров использовались мыши гетерозиготной по трансгену зеленого белка линии B10-GFP в возрасте 3–15 нед. Трансплантации КМ осуществлялись 15-месячным мышам той же линии B10, но не несущим трансген GFP, 6-кратно по 15–

17 млн клеток в 0,3 мл за раз с интервалом в 8–16 дней, что доводило количество трансплантированных клеток до  $1 \times 10^8$  на каждого реципиента. В контрольной группе было 20 мышей. Исходный размер экспериментальной группы 56 мышей, в динамику смертности контроля также вошла смертность экспериментальных мышей (25 из 56 мышей), умерших до момента трансплантации. В результате, МПЖ как средняя продолжительность жизни 10% долгожителей оказалась равна: 17.81 мес. в контроле против  $22.8 \pm 1$  мес. в эксперименте, что соответствует приросту 5.0 мес. или  $28 \pm 5\%$ . Период дожития с начала трансплантации (с возраста 15 мес.) увеличился в 2.8 раза. Трансплантированные мыши были активны и имели блестящую ровную шерсть к тому времени, когда умерла последняя мышь контрольной группы, малоподвижная и с множественными очагами алопеции. Через 6 мес. после трансплантации в различных тканях реципиента визуализируются флуоресцирующие структуры: в печени, селезенке, почках, мышцах. GFP-флуоресценция нуклеаров КМ была обнаружена в 7% клеток реципиента, что составляет 28% от флуоресцирующих клеток КМ донора (флуоресцирует только 25% от всех ядерных клеток КМ гетерозиготного донора,  $7 \times 100 / 25 = 28$ ). Степень химеризма, полученная другими авторами при неаблативной трансплантации 40 и 200 млн нуклеаров КМ, составляла 7 и 32%, соответственно. Мы полагаем, что большая эффективность встраивания КМ в нашей работе объясняется поздним возрастом наших реципиентов и истощением их КМ-пула, в отличие от молодых неаблатированных реципиентов предыдущих авторов. Очевидно, в преклонном возрасте иммунная система уже слишком пассивна, чтобы отторгать донорский КМ, но еще достаточно эффективно подавляет инфекции и реакцию трансплантата против хозяина, что делает излишним и нежелательным применение кондиционирования в старших возрастах. Таким образом, КМ-терапия особенно эффективна в преклонном возрасте, позволяющем как отказаться от жесткого миелоаблатирования, так и увеличить омолаживающий эффект.

**Ковина М.В., Платонова Л.В.,  
Крашенинников М.Е., Люндуп А.В.,  
Балясин М.В., Дюжева Т.Г.**

*Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова  
gershi2001@yahoo.com*

### **МОЖЕТ ЛИ ЭКСТРАКТ ИЗ РАСТУЩЕЙ ПЕЧЕНИ (HRS) СПОСОБСТВОВАТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОМУ ПЕРЕХОДУ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК?**

Ранее нами была показана эффективная стимуляция регенерации поврежденной печени *in vivo* при использовании экстракта неонатальной печени (Hepaticregenerationset HRS). Оценку влияния HRS *in vitro* проводили на мезенхимальных стромальных клетках (МСК) костного мозга и жировой ткани мышей, костного мозга крыс, костного мозга и эндометрия человека. Было установлено, что HRS защищает МСК и гепатоцитарные культуры от цитостатического действия бессывороточной и истощенной сред, хотя угнетающее действие бессывороточной среды на фибробласты линии L усиливалось в присутствии HRS вплоть до необратимой цитотоксичности. МСК человека после влияния HRS приобретают новую

морфологию и экспрессируют как эпителиальные маркеры (цитокератин 7, Е-кадгерин), так и маркеры региональных стволовых клеток печени (АВ, HNF-4). По-видимому, HRS способствует мезенхимально-эпителиальному переходу, подавляя фибробластоидный фенотип и индуцируя экспрессию эпителиальных и дуктальных маркеров в мезенхимальных клетках. Это сложный для мезодермальных МСК переход является промежуточной ступенью и необходимым условием возвращения плюрипотентности, ибо эктодерма является более ранним зародышевым листом, чем мезодерма. В то же время, обратный эпителиально- $\rightarrow$  мезодермальный переход характерен для метастатической эволюции эпителиальных опухолей, приобретающих с потерей эпителиальных маркеров инвазивность и способность к миграции, подобно МСК. Известно, что фибробластоидные МСК паракринно провоцируют инвазивное развитие предсуществующих опухолей. Можно предположить, что HRS может предотвратить онкологический риск МСК-терапии различных заболеваний.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-54-53090 ФГЕН\_a (2016-2017).*

**Кожухарова И.В., Алексеенко Л.Л.,  
Люблинская О.Г., Никольский Н.Н.**

*ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
kojuxarova@mail.ru*

### **ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДОКСОРУБИЦИНА НА МЕЗЕНХИМНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Доксорубин является эффективным противораковым препаратом с известным механизмом действия против широкого спектра злокачественных новообразований. Несмотря на обширное клиническое применение, его побочный эффект и негативное воздействие на нормальные, в частности, мезенхимные клетки мало изучены. Целью данной работы было исследование эффекта доксорубина на культивируемые мезенхимные клетки человека, полученные из менструальной крови (еМСК), костного мозга (ВМСК) и жировой ткани (АМСК). Мы обнаружили, что мезенхимные клетки различного происхождения высоко устойчивы к цитотоксическому действию доксорубина. Высокие концентрации (10–100 мкМ) вызвали постепенную гибель клеток в течение 3 дней, клинически значимая доза доксорубина (1–0,1 мкМ) не вызвала гибель клеток. Обработка препаратом в минимальной дозе в течение 24 ч. вызывала остановку клеточного цикла и накопление клеток в фазе G0/G1. Дальнейшее культивирование сопровождалось увеличением количества клеток, несущих мелкие фокусы  $\gamma$ -H2AX в ядрах, что коррелировало с увеличением количества SA- $\beta$ -Gal положительных клеток. ВМСК вступали в фазу преждевременного старения раньше, чем АМСК и еМСК. Дифференцировка мезенхимных клеток увеличивала чувствительность всех трех типов МСК к цитотоксическому действию доксорубина. Обработанные минимальной дозой (0,1 мкМ, 24 ч.) дифференцированные клетки демонстрировали более низкую жизнеспособность, быстрое образование фокусов  $\gamma$ -H2AX, они не подвергались преждевременному старению, а погибали. Кроме того, обработка доксорубином ингибировала секрецию BDNF (нейротрофический фактор) как в недиффе-

ренцированных eMCK, так и в индуцированных в нейрогенном направлении VMCK и eMCK.

Финансирование исследования: *Российский Научный Фонд, проект 14-50-00068.*

**Колеватых Е.П., Новопашина Ю.А.**

*Кировский медицинский университет  
hibica@mail.ru*

### **РОЛЬ МЕДИЦИНСКОЙ ПОЛИМЕРНОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ БИОПЛЕНКИ В РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ**

В настоящее время установлено, что природные популяции бактерий существуют в основном в виде закрепленных на субстратах биопленках. В их составе бактерии способны обмениваться сигналами и проявлять координированную активность, свойственную многоклеточным организмам. Цель — оценка эффективности применения искусственных пробиотических биопленок в поддержании гомеостаза макроорганизма. Объектами исследования служили ассоцианты микробиоценозов экспериментальных животных. Исследование осуществляли с помощью бактериологического, молекулярно-генетического (полимеразная цепная реакция), серологического (иммуноферментного анализа) методов. Нами была сконструирована искусственная пробиотическая биопленка, состоящая из синтетического саморасщепляющегося полимерного материала и пробиотических штаммов микроорганизмов: лактобактерий, бифидобактерий. Применяли при заполнении дефектов слизистых оболочек полости рта, пищевода, желудка, кишечника, влагалища, матки животных в эксперименте. Изучали состояние тканей: pH среды, структуру клеток, адгезивные свойства. Анализируя полученные результаты, необходимо отметить усиление конструктивной, сорбционной, окислительно-восстановительной, питательной, антагонистической функции. При наличии воспалительных процессов в микробном консорциуме обнаружили дрожжевые грибы рода *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*; редкие формы эшерихий: *E. hermannii*, *fergusonii*, *blatte*, *vulneris*; снижение количества секреторного иммуноглобулина А. Физиологическая биопленка стенки кишечника состоит преимущественно из бактерий родов *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*; патологическая биопленка стенки кишечника отличается недостаточным количеством лактобацилл, бифидобактерий, наличием редких форм эшерихий: *E. hermannii*, *fergusonii*, *blatte*, *vulneris*; при дефиците секреторного иммуноглобулина А в слизистых оболочках биотопов вегетируют дрожжевые грибы рода *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*; искусственная полимерная пробиотическая биопленка способствует созданию биосферы регенерации тканей: нормализация pH, локальной температуры, газового состава. Установлено, что регенерация тканей под полимерной медицинской пробиотической биопленкой происходит быстрее, чем при естественном процессе.

**Колобынина К.Г., Соловьева В.В.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
kolovininakseniya@gmail.com*

### **ТЕСКАЛЦИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АГЕНТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

В предыдущих исследованиях было показано участие EF-hand Ca<sup>2+</sup>-связывающего белка тескалцина во многих важных процессах в человеческом организме. Некоторые исследователи показали, что экспрессия тескалцина необходима для дифференцировки мегакариоцитов, а также опосредует механизм переключения дифференцировки в некоторых клеточных типах. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что этот белок может быть использован в различных биомедицинских приложениях. В настоящем исследовании было обнаружено, что модуляция экспрессии тескалцина влияет на дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека (MCK), выделенных из жировой ткани человека в остеогенном и адипогенном направлениях. Поскольку нативные MCK не экспрессируют тескалцин, с помощью лентивирусной трансдукции были получены линии MCK с эктопической экспрессией тескалцина (MCK-TESC). Далее полученные MCK-TESC инкубировали в дифференцировочной среде Stem Pro Osteogenesis или Adipogenesis is differentiation media (ThermoFisherScientificInc., USA) 18 или 14 дней, соответственно. Окраска Oil Red O и von Kossa выявили сравнительно большее количество дифференцированных клеток в остеогенном и адипогенном направлениях среди MCK со сверхэкспрессией тескалцина. Более высокий уровень интенсивности дифференцировки этих клеток наблюдали в сравнении с двумя контрольными линиями MCK и MCK с нокдауном тескалцина. С целью узнать больше о функции белка и выявить его потенциальные мишени, а также регуляторы, был проведен сравнительный транскриптомный анализ. MCK со сверхэкспрессией тескалцина обладали группой генов, понизивших свою экспрессию по сравнению с контролем, эта группа показала высокий уровень кластеризации. Функциональная аннотация выявленных генов позволила предположить, что тескалцин может быть связан с несколькими сигнальными путями заболеваний, таких как болезнь Чагаса и ревматоидный артрит; более того, были выявлены функциональные кластеры клеточной адгезии, нейроактивный лиганд-рецептор и цитокин-рецептор взаимодействий. Кластер генов сигнального пути хемокинов позволяет сделать предположение, что экспрессия тескалцина может иметь отношение к механизмам иммунной регуляции. Таким образом, наше исследование рассматривает тескалцин с точки зрения нового агента дифференцировки стволовых клеток человека и описывает его возможную роль в патогенезе различных заболеваниях человека.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ 15-44-02509 и программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

**Комарова М.Ю.<sup>1</sup>, Иванова О.А.<sup>1</sup>,  
Галенко В.Л.<sup>2</sup>, Леявина Т.А.<sup>2</sup>,  
Дмитриева Р.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический  
университет Петра Великого

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
margaritka96@yandex.ru

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ И РЕЗИДЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Атрофия мышечной ткани характерна для пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). Хроническая активация системы натрийуретических пептидов (НПС) в совокупности с нарушением работы митохондрий и/или нарушением в окислении жирных кислот предположительно являются механизмами, ведущими к развитию системных метаболических нарушений в скелетной мускулатуре у пациентов с ХСН. Влияние этих изменений на функционирование резидентных стволовых клеток мышечной ткани остаётся неизученным. Мы исследовали влияние ХСН на функциональные характеристики скелетной мускулатуры и свойства резидентных стволовых клеток мышечной ткани.

**МЕТОДЫ.** Биоптаты мышцы и резидентные стволовые клетки мышечной ткани получены от 3 здоровых доноров (ЗД) и 11 пациентов с изолированной ХСН (II–IV функциональный класс). После выделения и экспансии *in vitro* образцы стволовых клеток фенотипировали методом проточной иммуноцитометрии (CD105/CD90/CD73/CD166/CD146/CD56/PDGfα/b). В культуре индуцировали миогенную дифференцировку, эффективность оценивали методом ИЦХ (MYHC, desmin). Оценивали экспрессию генов методом Q-PCR: регуляторы миогенеза (MYMK/MyoG/MyoD/Mrf4/MYHs); регуляторы метаболизма и липидного обмена (αP2/GLUT1/PPARγ/Pgc1α/CD36/GOS/CG158/SCD1).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В мышечной ткани пациентов с ХСН выявлена тенденция к активации системы натрийуретических пептидов за счет снижения экспрессии рецептора NPRC ( $21 \pm 6$  vs  $7 \pm 2$ ), выявлен рост экспрессии эмбриональных/неонатальных миозинов  $1,8 \pm 0,3$  vs  $28 \pm 15$  (MYH8);  $15 \pm 13$  vs  $91 \pm 25$  (MYH3), что указывает на патологическую стимуляцию регенераторных процессов; снижение экспрессии Pgc1α ( $4,4 \pm 0,6$  vs  $2,2 \pm 0,4$ ) указывает на нарушение регуляции митохондриогенеза в скелетной мускулатуре пациентов с ХСН. Также, показаны различия в экспрессии генов, отвечающих за метаболизм липидов: ( $26 \pm 6$  vs  $48 \pm 18$  (CD36),  $16 \pm 5$  vs  $512 \pm 289$  (GOS),  $3 \pm 0,4$  vs  $8 \pm 2$  (CG158),  $3,6 \pm 1,3$  vs  $135 \pm 92$  (SCD1),  $1,9 \pm 0,6$  vs  $12 \pm 6$  (αP2), что свидетельствует о нарушениях липидного метаболизма и возможном развитии мышечной липотоксичности. Для MYH8/Pgc1α/NPRC/NPRB изменения были статистически достоверны, для остальных генов изменения отражают выраженную тенденцию. Тенденции, выявленные в биоптатах в целом не подтвердились ни в сателлитах ни в дифференцированных миотрубках. Исключение составили MYH8, экспрессия показала тенденцию к повышению в миотрубках ХСН ( $28 \pm 19$  vs  $49 \pm 16$ ); NPRC ( $7 \pm 4$  vs  $19 \pm 14$ ) и NPRB

экспрессия показала тенденцию к изменению в сателлитах ХСН ( $187 \pm 70$  vs  $400 \pm 146$ ), результатом может быть снижение активности НПС.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты позволяют предположить, что стволовая клетка мышечной ткани защищена от воздействия неблагоприятных внешних условий и ее активация может служить мишенью для терапевтического воздействия с целью коррекции метаболических нарушений, вызванных ХСН. Причины и механизмы, лежащие в основе нарушений экспрессии MYH8, NPRB и NPRC, регулирующих неонатальное развитие мышечной ткани и активность НПС в резидентной стволовой клетке мышечной ткани, нуждаются в дальнейших исследованиях.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ Соглашение № 16-15-10178 от 18 мая 2016 г.*

**Комлев В.С.<sup>1-2</sup>**

*Институт металлургии и материаловедения  
им. А.А. Байкова РАН*

*Федеральный научно-исследовательский центр  
«Кристаллография и фотоника» РАН*

### **ФУНКЦИОНАЛЬНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЕ МИНЕРАЛ-ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Работа направлена на решение фундаментальной научной проблемы, связанной с разработкой композиционных материалов (КМ) для изготовления новых типов специализированных биомедицинских изделий (пористых матриц для тканевой инженерии) методами аддитивных технологий. Конкретная задача состоит в разработке минерал-полимерных систем на основе кальцийфосфатных фаз и резорбируемых биополимеров, адаптированных к технологии 3D печати, для получения матриц с заданной архитектурой и свойствами. Для решения этой задачи изучены свойства дисперсий порошков фосфатов кальция варьированных химического, фазового состава и дисперсности в растворах различных биополимеров. Выявлены особенности взаимодействия компонентов в этих системах. Установлены процессы формирования каркасных структур из КМ, изучены их механические, химические и биологические свойства. Проведены эксперименты по модифицированию поверхности матриц и их свойств посредством минерализующей обработки в модельных жидкостях организма. Показана принципиальная возможность создания путем 3D печати биосовместимых функционально-ориентированных трехмерных конструктов с антибактериальной/противоопухолевой активностью и сохранением остеокондуктивных свойств. Выработаны рекомендации для перенесения технологий трехмерной печати разрабатываемых материалов и создания на этой основе специализированных биомедицинских изделий в области их практического использования.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ № 15-13-00108).*

**Комок В.В., Немков А.С., Белый С.А., Буненков Н.С.**

*ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет» им. И.П. Павлова*  
vladimir\_komok@mail.ru

**АУТОЛОГИЧНЫЕ МОНОНУКЛЕАРЫ КОСТНОГО МОЗГА В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА, ОСЛОЖНЕННОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАНДОМИЗИРОВАННОГО, СЛЕПОГО, ПЛАЦЕБО КОНТРОЛИРУЕМОГО ИССЛЕДОВАНИЯ)**

**ЦЕЛЬ.** Комплексная оценка безопасности, эффективности аутологичных мононуклеаров костного мозга (АМНКМ) в комбинированном лечении ишемической болезни сердца, осложненной хронической сердечной недостаточностью.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включено 117 пациентов. Сформированы группы наблюдения. В 1 группе пациентам выполнено аорто-коронарное шунтирование (АКШ), интрамиокардиальное введение 0.9% раствора NaCl, 2 группа: АКШ, интрамиокардиальное введение АМНКМ, 3 группа: АКШ, интрамиокардиальное и внутришунтовое введение АМНКМ. Контрольное обследование проведено через 1 год. Данное исследование зарегистрировано на Clinicaltrials.gov (NCT02059512).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В группах с дополнительной трансплантацией АМНКМ, по сравнению с группой контроля, отмечено статистически достоверное уменьшение функционального класса стенокардии напряжения, функционального класса сердечной недостаточности, улучшение сократительной способности сердца (систолическая, диастолическая функции левого желудочка), меньший процент нефункционирующих шунтов. Исходная диастолическая дисфункция миокарда левого желудочка значимо оказывает влияние на общую эффективность проводимого лечения.

**ВЫВОДЫ.** Трансплантация АМНКМ в дополнение к операции АКШ является безопасной методикой и может быть использована для улучшения общей эффективности хирургической реваскуляризации миокарда.

Финансирование исследования: *ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург.*

**Конопляников М.А.<sup>1</sup>, Кальсин В.А.<sup>2</sup>, Конопляников А.Г.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России*

<sup>2</sup> *Федеральный научно-клинический центр ФМБА России*

<sup>3</sup> *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России*  
mkonopl@mail.ru

**ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ САЛИНОМИЦИНА И ЕГО КОМПЛЕКСА С НАНОЧАСТИЦАМИ НА РОСТ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ**

Считается, что раковые стволовые клетки (РСК) ответственны за начало и рецидив опухоли после химиотерапии. Таргетирование РСК специфическими

соединениями может быть эффективным подходом к снижению роста опухоли и метастазирования.

**ЦЕЛЬ.** Исследование возможного терапевтического эффекта салиномицина, селективного ингибитора РСК, используемого как самостоятельно, так и в комбинации с наночастицами, на модели карциномы легкого Льюиса (LLC) мышей, а также на модели РСК in vivo при использовании 1,2-диметилгидразина.

**МЕТОДЫ.** В нашей работе были использованы лабораторные мыши двух штаммов – СВА и С57В1/6, 3-месячные самцы, массой 20–22 г. В проведенных исследованиях использовали салиномицин, как самостоятельно, так и в комплексе с детонационными наноалмазами (ДНА). Мышам С57В1/6 на 10-е сут. после перевивки опухоли вводили однократно внутривентриально 0,2 мл суспензии комплекса ДНА-салиномицин или такое же количество салиномицина. Наблюдали за динамикой роста опухоли и гибелью животных в группах. Часть подопытных и контрольных животных подвергали эвтаназии на 21-е сут. после перевивки опухоли, извлекали легкие, фиксировали в уксуснокислом спирте и подсчитывали количество опухолевых метастатических узлов в легочной ткани. Также на 10-е и 21-е сут. измеряли объем опухоли, подсчитывая соотношение данных объемов для каждого животного. Эффект салиномицина и комплекса ДНА-салиномицин также тестировали на модели РСК in vivo. Для этого мышам линии СВА вводили за одни сутки до общего гамма-облучения в дозе 6 Гр канцероген 1,2-диметилгидразин (20 мг/кг), повышающий радиорезистентность гемопозитических стволовых клеток (ГСК). На следующие сутки после гамма-облучения мышам подопытных групп вводили салиномицин или его комплекс с ДНА и через 8 сут. после облучения животных подвергали эвтаназии, извлекали селезенки, фиксировали и подсчитывали количество выросших из выживших после облучения ГСК селезеночных эндокolonий.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Было продемонстрировано, что на 21-е сут. салиномицин (и самостоятельно, и в комплексе с ДНА), замедлял скорость увеличения опухоли, по сравнению с контрольной группой, и при этом уменьшал количество метастатических узлов в легких ( $p < 0,05$ ). Контрольные животные погибали раньше животных в других группах, причем часть животных после применения комплекса ДНА-салиномицин выживали в течение всего периода наблюдения (60 дней). Наши результаты показывают, что салиномицин, в комплексе с ДНА, оказывает терапевтический эффект на выживаемость животных с опухолью легкого, за счет снижения метастатических поражений. Аналогичные результаты были получены и при моделировании РСК воздействием канцерогена 1,2-диметилгидразина на ГСК, при этом наибольший позитивный эффект также был обнаружен в случае введения мышам комплекса ДНА-салиномицин, хотя и воздействие одного салиномицина также уменьшало число регистрируемых селезеночных эндокolonий.

Финансирование исследования: *Исследование было проведено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Грант 16-15-10432).*



**Копейна Г.С.<sup>1</sup>, Замараев А.В.<sup>1</sup>,  
Животовский Б.Д.<sup>1,2</sup>, Лаврик И.Н.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Institute of Environmental Medicine, Division  
of Toxicology, Karolinska Institutet, Stockholm

<sup>3</sup> Institute of Experimental Internal Medicine,  
Otto von Guericke University, Magdeburg  
lirroster@gmail.com

**КАСПАЗА-2 КАК ИНИЦИАТОРНЫЙ БЕЛОК  
АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА  
В ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК**

Многие химиотерапевтические препараты, применяемые для лечения онкологических заболеваний, вызывают повреждения генетического материала и клеточных структур, что приводит к активации ряда сигнальных каскадов в клетках и запуску механизма их гибели по пути апоптоза. Апоптоз — наиболее изученная программа клеточной гибели — является важным биологическим процессом, происходящим в тканях и органах многоклеточных организмов. Основными ферментами апоптоза являются белки семейства цистеиновых протеаз — каспаз, которые синтезируются в неактивной форме и активируются в ответ на определенные стимулы. Одной из важнейших инициаторных каспаз, играющих центральную роль в запуске ответа на повреждения ДНК, является каспаза-2 (Zhivotovsky, 2005). Этот фермент также принимает участие в поддержании генетической стабильности клеток и их защите от окислительного стресса, а его отсутствие у мышей приводит к преждевременному старению (Shalini, 2012). Однако, механизм активации каспазы-2 до сих пор плохо изучен. Для исследования этих механизмов апоптоз в клетках карциномы яичника линии Саov-4 был индуцирован с помощью ДНК-повреждающего химиотерапевтического препарата цисплатина. Анализ уровня гибели методом проточной цитометрии показал, что в клетках с пониженным содержанием каспазы-2 (Саov-4-shRNA-каспаза-2) наблюдалось заметное снижение процента апоптотических клеток по сравнению с клетками дикого типа, что подтверждало центральную роль каспазы-2 в процессе апоптоза при генотоксическом стрессе. Аналогичные результаты были получены с помощью метода siРНК, который продемонстрировал существенное снижение уровня расщепления субстрата каспазы-3 — белка PARP — при подавлении синтеза каспазы-2. Гель-фильтрационный анализ лизатов контрольных и обработанных цисплатином клеток показал, что в клетках линии Саov-4 в ответ на повреждение ДНК происходит формирование высокомолекулярного комплекса, содержащего каспазу-2. Выделение этого комплекса с помощью иммунопреципитации и последующий анализ методом Вестерн-блота подтвердил, что в его состав не входит белок RAIDD, который является адаптором между каспазой-2 и белком PIDD в ранее описанном комплексе активации PIDDosome (TinelandTschopp, 2004). Использование siРНК против RAIDD показало, что активация каспазы-2 и развитие процесса апоптоза не зависят от уровня данного белка в клетках. Мы показали, что в условиях генотоксического стресса каспаза-2 активируется в составе не описанного в литературе высокомолекулярного комплекса. Для идентификации состава данного комплекса был проведен масс-спектрометрический анализ интерак-

томы каспазы-2 в контрольных и обработанных цисплатином клетках. Проведенный анализ выявил ряд белков-партнеров каспазы-2, и в первую очередь киназу САМКII, фосфатазу РР1 и убиквитин-лигазу ТРИМ21, которые участвуют в регуляции активации данного белка за счет пост-трансляционных модификаций и могут таким образом контролировать клеточную гибель. Полученные данные позволяют однозначно выделить важную роль данного комплекса в активации каспазы-2 и индукции апоптоза.

Финансирование исследования: Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 17-75-20-102.

**Копелев П.В.<sup>1</sup>, Александрова С.А.<sup>2</sup>,  
Нащекина Ю.А.<sup>2</sup>, Блинова М.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический  
университет Петра Великого

<sup>2</sup> ФГБУН ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
raха94@bk.ru

**РАЗРАБОТКА БИМЕДИЦИНСКОГО  
КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ  
ПОЛИЛАКТИДА И ММСК КОСТНОГО МОЗГА  
ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ  
ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ**

В настоящее время активно разрабатываются подходы к созданию биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), предназначенных для восстановления хрящевой ткани, в которых доставка стволовых клеток с хондрогенным потенциалом происходит в составе трехмерных искусственных скаффолдов. Полилактид является биodeградируемым полимерным материалом на основе молочной кислоты, который может быть использован для получения скаффолдов требуемой формы и степени пористости.

**ЦЕЛЬ.** Оценка возможности использования полилактита в качестве скаффолда, входящего в состав БМКП для замещения хрящевой ткани.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В работе использовали мультитипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ), выделенные из конечностей новорожденного кролика. Для культивирования клеток использовали трехмерные скаффолды из поли(L-L)лактита, приготовленные методом выщелачивания, или полилактидные пленки, которые в условиях эксперимента *in vitro* наносили на покровные стекла.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Исследование жизнеспособности ММСК КМ при культивировании на стеклах, покрытых полилактидной пленкой, и на трехмерных полилактидных скаффолдах в течение 26 сут. показало, что клетки не претерпевают морфологических изменений. На снимках трехмерных скаффолдов (сканирующая электронная микроскопия, СЭМ) были обнаружены клетки, прикрепленные непосредственно к поверхности полилактидного скаффолда. Для проверки способности ММСК КМ к дифференцировке в хондрогенном направлении клетки высаживали на стекла с полилактидной пленкой и на трехмерные полилактидные скаффолды и культивировали в дифференцировочной среде в течение 26 сут. Анализ трехмерных скаффолдов методом СЭМ показал скопления клеток, напоминающие хондрогенные узелки. Исследование экспрессии коллагена II типа, характерного для хондрогенной дифференцировки, выявило, что клетки на полилактидных пленках в дифференцировочной среде синтезируют его больше, чем в ростовой (контрольный вариант).

**ВЫВОДЫ.** Исходя из полученных результатов, можно предполагать, что полилактидные скаффолды не являются токсичными для клеток ММСК КМ и не влияют на их способность к дифференцировке в хондрогенном направлении.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-50-00068 Стволовые клетки — основа клеточных технологий.*

**Астахова Н.М., Корель А.В., Кирилова И.А.**

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» им. Я.Л. Цивьяна»  
Минздрава России  
akorel@gmail.com

### **РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛОВ ВЫДЕЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

Одной из главных проблем травматологии остается замещение дефектов костной ткани. В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т.д. Костный мозг является источником мультипотентных стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в стромальные, остеогенные, хондрогенные и жировые клетки. Целью настоящего эксперимента являлась разработка протоколов выделения и типирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из аспирированных костного мозга человека. В качестве источника МСК человека использовался аспират костного мозга резецированных головок бедренных костей пациентов с коксартрозом от двух доноров. Во время культивации полученных МСК было выделено несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки. МСК достигали конfluence к 16–18 день инкубации, без замедления пролиферативной активности клеток и без потери характеристик ранних предшественников. Исследование мультипотентного потенциала МСК человека проводили культивированием данных клеток в стандартной остеогенной среде. Было выявлено, что на 3-и сут. инкубации морфология клеточно-го типа менялась от веретенообразных «стволовых» к полигональным «остеобластным». С увеличением срока культивирования МСК в остеогенной среде возрастала экспрессия фермента щелочной фосфатазы, что связано с участием этого фермента в формировании кристаллов гидроксиапатита во внеклеточном матриксе. Интенсивность реакции на щелочную фосфатазу оценивали на 18-е сут. эксперимента, по интенсивности окрашивания. Завершение остеогенной дифференцировки и созревание остеобластов с формированием кальцификатов было подтверждено интенсивным окрашиванием на ализариновый красный. В клеточных группах плотности минерализации пропорциональна интенсивности окраски на ализариновый красный. Иммунофенотипический анализ показал, что профили экспрессии поверхностных антигенов, культивируемых МСК, соответствовали принятым стандартам. Более 90% клеток экспрессировали CD90, CD73, CD105 — положительные маркеры, что доказывает их принад-

лежность к типичным стволовым клеткам. В то же время, более 95% клеток были негативны по CD45 (общий лейкоцитарный антиген) и по CD34 (маркер ранних кроветворных предшественников), что свидетельствует об отсутствии примесей этих клеток в популяции МСК. Иммунофенотипический анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) МСК человека, выделенные из костного мозга, представляют собой практически однородные (гомогенные) популяции типичных стволовых клеток. Таким образом, аспират костного мозга от взрослых пациентов является источником стволовых клеток, которые удовлетворяют всем критериям для МСК, определенным Международным обществом клеточной терапии.

Финансирование исследования: *Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)».*

**Корниенко Ю.С.<sup>1,2</sup>, Смирнова И.С.<sup>1</sup>,  
Пуговкина Н.А.<sup>1</sup>, Зенин В.В.<sup>1</sup>,  
Никольский Н.Н.<sup>1</sup>, Люблинская О.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
kornienko.js@gmail.com

### **ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ПРОЦЕСС САМООБНОВЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

В настоящее время окислительный стресс считается важной составляющей развития многих заболеваний человека, а также процесса старения организма. В связи с этим, различные антиоксидантные добавки к пище получили широкое распространение среди жителей развитых стран. Тем не менее, мало кто берет в расчет тот факт, что положительный эффект от применения антиоксидантов был доказан лишь в моделях искусственно индуцированного окислительного стресса *in vivo* и *in vitro*, и вопрос влияния экзогенных антиоксидантов на здоровые клетки организма, поддерживающие физиологически-релевантный внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК), до сих пор не до конца изучен. Тканеспецифические стволовые клетки взрослого организма являются основным источником обновления всех тканей. Однако, несмотря на популярность антиоксидантов как агентов, потенциально защищающих клетки от вредоносного действия свободных радикалов и потенциально замедляющих процесс старения организма, мало что известно о влиянии антиоксидантов на самообновление и дифференцировку здоровых тканеспецифических стволовых клеток организма. В настоящей работе был исследован ответ мезенхимальных стволовых клеток человека, полученных от здоровых доноров, на обработку рядом экзогенных антиоксидантов различного происхождения и различных механизмов действия (tempol, resveratrol, NAC, DPI). Основная цель работы заключалась в анализе влияния антиоксидантов на самообновление МСК. Эксперименты проводились с синхронизированными в G0/G1-фазах клеточного цикла МСК и обработка антиоксидантами осуществлялась после их стимуляции к пролифера-

ции. Было получено, что высокие терапевтические дозы антиоксидантов, активно применяемые в других исследованиях в качестве протекторных агентов и существенно понижающие внутриклеточный уровень АФК, но не приводящие к клеточной гибели, блокируют процесс самообновления МСК. Было обнаружено, что обработка МСК антиоксидантами нарушает регуляцию клеточного цикла путем активации пост-трансляционной деградации ключевых белков, необходимых для корректного протекания фазы синтеза ДНК — циклина А, геминина и Emt1. Кроме того, было показано, что обработка пролиферирующих культур МСК антиоксидантами приводит к накоплению повреждений ДНК и активации pATM/p-p53 — пути ответа на повреждения ДНК, приводящего к блокированию клеточной пролиферации. Интересно, что всего лишь суточной инкубации пролиферирующих МСК с антиоксидантами было достаточно для неспособности обработанных клеток восстановить свою пролиферацию и репарировать повреждения ДНК при дальнейшем культивировании в стандартных условиях. Суточная инкубация пролиферирующих МСК с антиоксидантами приводила к накоплению молекулярных маркеров стресс-индуцированного преждевременного старения клеток (повышению уровней p-p53, p21,  $\beta$ -galactosidase и понижению уровня p-pRb) спустя более 4 сут. после перевода клеток на свежую среду без антиоксидантов, а также приводила к увеличению геометрических размеров клеток, что также является общепринятым признаком старения клеток. Таким образом, было показано, что высокие терапевтические дозы антиоксидантов блокируют процесс самообновления МСК, нарушая регуляцию клеточного цикла и вызывая генотоксический стресс, что приводит к запуску программы стресс-индуцированного преждевременного старения клеток.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 14-50-00068.*

**Корсаков И.Н.<sup>1</sup>, Пулин А.А.<sup>1</sup>, Еремин И.И.<sup>1</sup>, Самчук Д.П.<sup>2</sup>, Зорин В.Л.<sup>3</sup>, Копнин П.Б.<sup>4</sup>, Бозо И.Я.<sup>3</sup>, Деев Р.В.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

<sup>3</sup> ПАО «Институт стволовых клеток человека»

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
ikorsakov@yandex.ru

#### **ВЛИЯНИЕ ВИТАЛИЗАЦИИ ИМПЛАНТИРУЕМОГО ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА ТЕЧЕНИЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**

Одним из наиболее перспективных способов лечения объемного повреждения мышечной ткани признается замещение дефекта тканеинженерными конструкциями на основе децеллюляризованного межклеточного матрикса. В экспериментальных исследованиях для замещения объемных дефектов мышечной ткани используются как бесклеточные, так и заселенные клетками (витализированные) матриксы. Результаты исследований, направленных на

сравнение эффективности имплантации бесклеточных и витализированных матриксов, однако, весьма противоречивы. Целью исследования являлось изучение влияния витализации децеллюляризованного межклеточного матрикса, полученного из мышечной ткани на течение раневого процесса после экспериментального повреждения скелетной мышцы. Децеллюляризация поперечно-полосатой мышечной ткани осуществлялась 1% раствором додецилсульфата натрия в течение 72 ч. с последующей промывкой образца в 1% растворе тритона-X100, что, как было показано нами ранее, вызывает достаточное удаление клеточного материала из мышечной ткани с сохранением структуры матрикса. После децеллюляризации образец помещался для дополнительной отмывки в фосфатно-солевой буфер (PBS) на 72 ч. Образцы стерилизовались в 1% растворе надуксусной кислоты и хранились в растворе PBS с пенициллин-стрептомицином 100U–100 мгк/мл, гентамицином 80 мгк/мл, и амфотерицином В 80 мгк/мл. Матриксы витализировались мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) десны кролика. Для этого на матриксы размерами 10×10×10 мм наносили несколько капель суспензии ММСК (концентрация 2 млн/мл) трехкратно 3–4 раза в течение часа. После этого конструкция заливалась культуральной средой и инкубировалась в стандартных условиях. Исследование выполнено на 16 кроликах породы Новозеландская белая, матриксы имплантировались в дефект длинной мышцы спины, с одной стороны имплантировался витализированный матрикс, в контрлатеральную мышцу — бесклеточный. Кролики выводились из эксперимента на 35 сут., образцы мышц с имплантированными тканеинженерными конструкциями забирались для гистологического исследования. Послеоперационный период имплантации у всех животных протекал без осложнений, при заборе образцов тканей визуально не наблюдалось местной реакции на имплантированные конструкции. При гистологическом исследовании во всех случаях выявлены резорбция и реконструкция имплантированного материала, сопровождающиеся активным миогенезом. Была выявлена инфильтрация матрикса гистиоцитами и сегментоядерными нейтрофилами. В отдельных случаях наблюдалось прорастание имплантированных конструкций кровеносными сосудами и нервными волокнами. Не было выявлено значимых различий между витализированными и бесклеточными конструкциями.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).*

**Космачева С.М.<sup>1</sup>, Флебоказов Ф.П.<sup>2</sup>, Рушкевич Ю.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий

<sup>2</sup> РНПЦ психического здоровья

<sup>3</sup> РНПЦ неврологии и нейрохирургии

4kosmacheva@mail.ru

#### **ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В НЕВРОЛОГИИ**

ВВЕДЕНИЕ. При нейродегенеративных и острых неврологических патологиях не может быть достигнуто полное восстановление функции центральной

нервной системы с использованием современных терапевтических средств (несмотря на симптоматические улучшения). Терапия на основе стволовых клеток изучается во всем мире и рассматривается как перспективное направление в лечении неврологических заболеваний.

**ЦЕЛЬ.** Оценить эффективность трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с симптоматической эпилепсией и боковым амиотрофическим склерозом (БАС).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включены 40 пациентов с симптоматической эпилепсией с устойчивостью не менее чем к 3 основным противосудорожным препаратам (20 пациентов – основная группа и 20 пациентов – группу сравнения) и 25 пациента с БАС (10 – основная группа и 15 – группа сравнения). В основной группе пациенты наряду с базовой терапией лекарственными средствами получали курс клеточной терапии аутологичных МСК костного мозга, включающий однократное внутривенное введение интактных клеток и через 6–7 дней – эндолюмбальное введение нейроиндуцированных клеток.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** У пациентов с симптоматической эпилепсией благоприятный клинический эффект был достигнут у 17 пациентов основной группы через 1–2 мес. после введения аутологичных МСК. Наибольший клинический эффект получен у пациентов основной группы по показателю генерализованных судорожных приступов: снижение частоты приступов более чем на 50% отмечено у 12 пациентов (60%). Резистентность к клеточной терапии наблюдалась у 3 пациентов основной группы (15%). В группе сравнения только у 1 из 20 пациентов приступы отсутствовали в течение 6 мес. после проведенной фармакотерапии, у 4 из 20 пациентов отмечалось уменьшение частоты приступов, у остальных – улучшение не отмечалось. При динамическом наблюдении за тяжестью заболевания у пациентов с БАС выявлены значимые различия результатов конечных осмотров: среднее количество баллов по шкале ALSFRSR основной группы составили 34 (29; 37), в группе сравнения – 16 (12; 23) ( $p < 0,001$ ); по шкале Карновского – в основной группе – 70% (50; 70); в группе сравнения – 20% (20; 30) – ( $p < 0,001$ ) (критерий Манн – Уитни (U-Test)). Динамика коэффициентов темпов прогрессирования клинической симптоматики и снижения функциональных возможностей была достоверно ниже в основной группе пациентов с БАС, получавших клеточную терапию МСК, в сравнении с группой сравнения: по показателям шкалы ALSFRSR – 0,38 (0,29; 0,80) против 1,47 (1,0; 1,58) ( $p = 0,003$ ), а по показателям шкалы Карновского – 0,83 (0,0; 2,0) и 3,07 (2,14; 3,75) соответственно ( $p = 0,006$ ). Клеточная терапия в виде комбинированного введения аутологичных МСК пациентам с БАС способствовала снижению темпа прогрессирования заболевания, более позднему присоединению бульбарно-псевдобульбарного синдрома и дыхательных нарушений.

**ВЫВОДЫ.** Полученные данные подтверждают безопасность и перспективность использования аутологичных МСК костного мозга при лечении фармакорезистентной симптоматической эпилепсии и бокового амиотрофического склероза.

Финансирование исследования: *Республиканский бюджет, средства союзного государства.*

**Костарной А.В., Ганчева П.Г.**

*ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»*

*Минздрава России*

*kostarnoy@yandex.ru*

### **ТАРГЕТИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ РАН**

Терапия трофических язв, диабетических ран, пролежней требует применения широкого арсенала лекарственных средств, во многих случаях вызывает необходимость стационарного лечения и зачастую оказывается недостаточно эффективной. Работы, опубликованные в последние 5–7 лет, показали ключевую роль рецепторов врожденного иммунного ответа в регуляции репаративных процессов. Рецепторы врожденного иммунитета экспрессируются широким спектром клеток кожи. Активация рецепторов врожденного иммунного ответа их лигандами, являющимися структурными компонентами бактерий или вирусов, индуцирует эндогенную секрецию спектра цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и других факторов, регулирующих процесс репарации. Нами впервые показано, что местное стимулирование рецептора TLR4 (представителя семейства Toll-подобных рецепторов врожденного иммунного ответа, TLRs) его лигандом, бактериальным липополисахаридом энтеробактерий (ЛПС), приводит к ускорению процесса репарации на моделях *in vivo*. Нанесение бактериального липополисахарида на область раневого дефекта вызывает дозозависимое уменьшение площади раны, ускоряет эпителизацию раневых дефектов, способствует более быстрому завершению воспаления, стимулирует раннюю инфильтрацию макрофагов в края раны, стимулирует ангиогенез, приводит к избирательному повышению секреции спектра медиаторов, вовлеченных в процесс репарации, в том числе хемокинов, провоспалительных цитокинов и факторов роста в области раневого дефекта. Использование полногеномного RNA-microarray анализа позволило детально изучить изменение экспрессии генов в области раневого дефекта в ответ на нанесение бактериального липополисахарида. Основываясь на полученных данных, была проведена фармацевтическая разработка лекарственного препарата, содержащего в качестве активного компонента бактериальный липополисахарид («ЛПС», гель для наружного применения). Были успешно проведены доклинические и I и II фазы клинических исследований разработанного лекарственного препарата. По результатам проведенного многоцентрового двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования II фазы установлено, что исследуемый препарат обладает приемлемым профилем безопасности при применении пациентами как в условиях стационара, так и при амбулаторном использовании, и эффективен для терапии хронических ран (диабетических ран/язв нижних конечностей, в том числе синдрома диабетической стопы, и трофических язв голени вследствие хронической венозной недостаточности). Применение препарата «ЛПС», гель для наружного применения в дозировке 10 мг/г по сравнению с применением плацебо значительно ускоряло уменьшение площади раны, при этом отличия были статистически достоверными. Таким образом, на примере таргетирова-

ния рецептора TLR4 показано, что местное стимулирование рецепторов врожденного иммунного ответа можно рассматривать как перспективную, клинически применимую стратегию ускорения процессов заживления ран, в том числе хронических ран, трудно поддающихся лечению.

Финансирование исследования: *Государственный контракт № 12411.1008799.13.112 от 4 июля 2012 г. Грант Президента РФ № МК-5205.2015.7.*

**Антонова Е.И., Ленгесова Н.А., Костина О.М., Федотова С.В., Кандрашина А.В., Соловьев А.В.**

*ФГБОУ ВО «Ульяновский педагогический университет им. И.Н. Ульянова»*

*НИЦ ФППББ*

*Kostinaom197@mail.ru*

### **ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПРОДУКТ НА РАЗЛИЧНЫХ НОСИТЕЛЯХ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

Значительные успехи в области экспериментальной эмбриологии, цитологии, молекулярной генетики и геной инженерии привели к формированию новой области биомедицины — регенеративной медицины. Регенеративная медицина является ярким примером стирания граней между фундаментальными и прикладными исследованиями, взаимодействия различных научных дисциплин, определяющую роль данного медицинского направления играет биологическая база исследований. Трансплантируемые клеточные суспензии или агрегаты самостоятельно встраиваются в трехмерную структуру исходной ткани и интегрируются с окружающей тканью. В связи с этим крайне актуальным является: создание молекулярно-клеточных продуктов для развития технологий заместительной регенеративной терапии, токсикологических исследований и доклинических испытаний после воздействия на организм повреждающих факторов различного генеза (радиологического, химического, физического и т.д.), а также применение клеточных продуктов в практике медицинских учреждений. На базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии (НИЦ ФППББ) ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» началась работа по созданию молекулярно-клеточных продуктов для развития технологий заместительной регенеративной терапии. На сегодняшний день получен первый клеточный продукт, который в ближайшее время может быть использован в качестве клеточной терапии в образовании грануляционной ткани, которая является основой для эпителизации раны кожного покрова. Источником фибробластов являлись дермальные биоптаты кожи человека. После забора материал сразу помещали в транспортную среду, в которой биоптат находился сутки при температуре 24°C. В лаборатории Клеточных технологий НИЦ ФППББ УлГПУ дермальные биоптаты механически измельчались, инкубировались с раствором коллагеназы I типа. Далее клеточный материал пересаживали в полную среду инкубации, сбалансированную для культивирования фибробластов и кератиноцитов. Дальнейшее культивирование осуществлялось на трех типах носителей — коллагеновая матрица, для заживления поверхностных обширных ран; микроносители Cytodex 3; вставки мембранные с коллагеновым покрытием Corning Transwell-COL. Клеточный продукт на трех

носителях применяется для заживления ран на животных в рамках прохождения доклинических испытаний. Проведено HLA-генотипирование с использованием набора Micro SSP Generic HLA Class I&II (ABDR) (OneLambda) на определение гистосовместимости тканей. ПЦР-анализ кондиционированной клетками среды — определение вирусных и микоплазменных контаминантов и простейших. Использовались праймеры к 25 возбудителям.

**Котлярова М.С.<sup>1</sup>, Архипова А.Ю.<sup>1</sup>, Мойсенович А.М.<sup>1</sup>, Куликов Д.А.<sup>2</sup>, Молочков А.В.<sup>2</sup>, Мойсенович М.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

<sup>2</sup> *Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского*  
*kotlyarova.ms@gmail.com*

### **ТРЕХМЕРНЫЕ ПОРИСТЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Создание костных имплантатов для восстановления повреждений скелетных тканей представляет собой актуальную клиническую проблему. Использование тканеинженерных скаффолдов на основе биodeградируемых материалов является одним из возможных ее решений. Фиброин шелка — прочный и биорезорбируемый полимер с высокой биосовместимостью, что позволяет рассматривать его как основу для получения таких конструкций. На основе фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* были получены трехмерные пористые скаффолды в виде губок, сформированные методами выщелачивания (СВ) и замораживания-оттаивания (СЗО). Также образцы были модифицированы путем осаждения на их поверхности кристаллов фосфата кальция и, таким образом, были получены минерализованные производные скаффолдов, изготовленных методом выщелачивания (МСВ) и замораживания-оттаивания (МСЗО). Структуру образцов изучали методами сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. Для оценки биосовместимости *in vitro* на скаффолдах культивировали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ) и мезенхимальные стволовые клетки мыши (МСК). Проверку остеоиндуктивного и остеокондуктивного потенциалов полученных скаффолдов проводили в модели дефекта бедренной кости крысы линии Wistar с использованием гистологических методов анализа тканей, сформированных на месте повреждения. Полученные скаффолды всех четырех видов обладали равномерной пористой структурой. СВ и МСВ характеризовались большим диаметром пор и толщиной стенок, а также были жестче, чем СЗО и МСЗО. Поверхность минерализованных скаффолдов была покрыта кристаллами фосфата кальция. Скаффолды поддерживали адгезию и пролиферацию МЭФ и МСК, более 95% клеток сохраняли жизнеспособность на 7 день культивирования. В эксперименте *in vivo* все типы скаффолдов способствовали восстановлению ткани в области дефекта. Наилучший результат был достигнут при использовании МСВ. Гистологическое исследование, проведенное через четыре недели после операции, показало присутствие взаимодействующих с материалом скаффолдов остеобластов, остецитов и остеокластов. Наличие внутри имплантата клеток,

участвующих в регенерации кости, свидетельствует об остеоиндуктивных и остекондуктивных свойствах использованных скаффолдов. Таким образом, полученные скаффолды на основе фиброина шелка могут быть использованы для восстановления костной ткани. Скаффолды, полученные методом выщелачивания, оптимальны для костной тканевой инженерии, а минерализация скаффолдов этого типа приводит к усилению остеоиндуктивных и остекондуктивных свойств, что подтверждается наличием многочисленных очагов остеогенеза в месте дефекта.

Финансирование исследования: *Работа осуществляется при поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 октября 2015 г. № 14.607.21.0119 «Создание набора прототипов изделий из биоискусственной костной ткани и модуляторов остеогенеза для регенеративной медицины», уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60715X0119.*

**Котова А.В.<sup>1,2</sup>, Шумеев А.Н.<sup>2,3</sup>, Золина Т.Л.<sup>2</sup>, Левчук К.А.<sup>2</sup>, Александрова Л.В.<sup>2</sup>, Иволгин Д.А.<sup>2,4</sup>, Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> ООО «Покровский банк стволовых клеток»

<sup>3</sup> ФГБУН «Зоологический институт» РАН

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России  
anastkotova@gmail.com

### **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПЧОГНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) пупочного канатика (ПК) являются перспективным источником для клинического применения, поскольку обладают рядом преимуществ по сравнению с МСК костного мозга (Kernet al., 2006; Arutyunyan et al., 2016). Обычно клетки культивируют с использованием сред, содержащих фетальную бычью сыворотку, что в клиническом применении создаёт многочисленные угрозы безопасности пациента, включая инфекции и аллергические реакции. Однако компаниями-производителями были разработаны бессывороточные среды и среды с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов. Целью работы являлось сопоставление морфологических и иммунофенотипических характеристик МСК ПК, а также их пролиферативного и дифференцировочного потенциалов при культивировании в разных средах: 1) StemPro® MSCSFMTS™ (LifeTechnologies)-бессывороточной среде с пониженным содержанием животных компонентов; 2) StemPro® MSCSFMXenoFree (LifeTechnologies) – бессывороточной среде без компонентов животного происхождения, в обоих случаях использовали флаконы, покрытые CTS™ CELLstart™ Substrate (LifeTechnologies); 3) MesenPRORS™ (LifeTechnologies) – среде с пониженным (2%) содержанием сыворотки; 4) DMEMLowGlucose (HyClone), содержащей 10% ASCMMesenchymalStemCellGrowthSupplement (HyClone). МСК ПК культивировали в течение 14–16 сут. (4 пассажа), на каждом пассаже проводили морфологическую характеристику клеток с помощью анализа фотографий случай-

но выбранных полей зрения ( $n = 15$ ), полученных с использованием светового инвертированного микроскопа Axiovert 40C (Zeiss). Методом проточной цитометрии определили иммунофенотип МСК ПК и его соответствие минимальным критериям МСК (CD90+/CD105+/CD73+/CD44+/CD34-/CD45-/CD14-/CD117- на 1-м и 4-м пассажах. В каждой из использованных сред на 1-ом пассаже морфология и иммунофенотип основной части популяции соответствовали МСК. Однако, в средах 1, 3, 4 наблюдались небольшие (до 1.5%) субпопуляции клеток, не являющихся МСК. При использовании среды 2 популяция МСК была однородной и не содержала субпопуляций. Однако на 4 пассаже в среде 2 произошло открепление клеток от субстрата. В среде 1 к 4-му пассажу в клетках резко (на 40%) снизился уровень экспрессии основных маркеров МСК—CD90, CD105. В средах 3 и 4 клетки сохранили иммунофенотип МСК, активно пролиферировали, однако сохранялась одна из минорных (не более 1%) субпопуляций со сниженным содержанием CD44. Наиболее высокая активность пролиферации показана для клеток, культивируемых на средах 3 и 4, также наблюдалась тенденция к меньшему числу прироста МСК при культивировании на средах 1 и 2. Анализ способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях проводили на 4 пассаже. Таким образом, среда 2 является оптимальным выбором для короткого (1-2 пассажа) культивирования, поскольку не содержит животных компонентов и обладает максимальными селективными свойствами в отношении МСК, для длительного культивирования возможно использование среды с пониженным содержанием сыворотки 3.

Финансирование исследования: *РФФИ 16-34-01163; НИР гос. задания Минздрава России «Исследование морфо-функциональных свойств мезенхимных стволовых клеток при длительном культивировании in vitro», реализуемые в СЗГМУ им. И.И. Мечникова; образцы культуральных сред предоставлены компанией Хеликон.*

**Котова П.Д., Тарасов М.В., Быстрова М.Ф.**

ФГБУН «Институт биофизики клетки» РАН  
polinakotova88@gmail.com

### **СИГНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ АГОНИСТАМИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Во многих работах показано, что присутствие агонистов пуринаргических рецепторов в среде культивирования мезенхимных стволовых клетках (МСК) стимулирует их дифференцировку в адипогенном направлении. Также ранее нами было показано, что АТФ стимулирует Ca<sup>2+</sup>-сигнализацию в МСК. Однако рецепторные и сигнальные механизмы этого явления оставались не исследованными. В настоящей работе нами проводился функциональный, фармакологический и экспрессионный анализ пуринаргической системы МСК с целью охарактеризовать рецепторные и сигнальные системы, вовлеченные в генерацию Ca<sup>2+</sup>-сигналов в МСК в ответ на пуринаргические агонисты. Исследования проводились на первичной культуре МСК человека, выделенных из жировой ткани взрослых доноров, полученной при плановых операциях. Анализ экспрессии МСК пуринаргических рецепторов проводился методом ОТ-ПЦР.

Сигнальные процессы исследовались с использованием микрофотометрии ( $\text{Ca}^{2+}$ -imaging), фотолиза химических групп ( $\text{Ca}^{2+}$ -uncaging), электрофизиологического метода patchclamp и ингибиторного анализа. Методами ОТ-ПЦР в популяции МСК были выявлены транскрипты генов ряда метаболитных пуринарецепторов, включая P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13 и P2Y14. С использованием специфических агонистов и антагонистов P2Y-рецепторов методом  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging нами было показано, что отдельные МСК несут функциональные пуринарецепторы одного или нескольких типов, однако ни одна клетка не обладала полным набором пуринарецепторов, выявленным для популяции. Ключевым АТР рецептором МСК является P2Y11. Ответы на ADP МСК генерировали только если оба P2Y1 и P2Y13 рецептора были функциональны. Чувствительность МСК к УТР обеспечивалась преимущественно P2Y4 рецептором, хотя небольшая субпопуляция УТР-чувствительных клеток также использовала и P2Y2 рецептор. Кальциевые ответы на UDP генерировали единичные клетки за счет активации P2Y6 рецепторов. Данные, полученные методами  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging и  $\text{Ca}^{2+}$ -uncaging, позволяют предположить, что при генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на АТР в МСК события происходят в следующей последовательности: активированный при связывании агониста P2Y рецептор посредством G-белка активирует фосфолипазу C, которая гидролизует PIP2 до IP3 и DAG. В свою очередь, IP3 стимулирует IP3-рецепторы, что приводит к первоначальному выбросу депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , скорее всего, зависящему от концентрации агониста. Этот первоначальный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал стимулирует масштабный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, что и продуцирует вторичный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ, не зависящий от концентрации агониста. Сочетание методов  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging и patchclamp позволило установить, что вызванный АТР  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ ведет к гиперполяризации мембраны пуринаргических МСК за счет стимуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов  $\text{KCa1.1}$ - и  $\text{KCa3.1}$ -типов. Таким образом, нами выявлены P2Y рецепторы, обеспечивающие чувствительность МСК к нуклеотидам, и прослежены ключевые внутриклеточные события, стимулируемые пуринаргическими агонистами в этих клетках.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантами РФФИ № 16-34-00210 мол\_а, № 17-44-500625 p\_а.*

**Кочегура Т.Н.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>1</sup>,  
Ефименко А.Ю.<sup>1</sup>, Овчинников А.Г.<sup>2</sup>,  
Агеев Ф.Т.<sup>2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
t\_kochegur@mail.ru

#### **ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФАКТОРОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ ХСН**

**ЦЕЛЬ.** Оценить прогностическое значение циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК), эндотелина-1, натрийуретических пептидов (НУП), ангиогенного фактора роста гепатоцитов (HGF) и параметров эхокардиографии у больных

ишемической ХСН в ходе четырехлетнего проспективного исследования.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В проспективное исследование было включено 55 больных ишемической ХСН, часть из которых в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Количественный анализ циркулирующих ПЭК проводили методом поточной цитофлуориметрии (MoFlo, BeckmanColter, США). Определение НУП (MR-proANP и NT-proBNP), эндотелина-1 и HGF проводили методом ИФА (ELISA). Анализ прогностической значимости исследованных факторов проводили методом логистической регрессии (множественная регрессия с логит-преобразованием).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** По результатам четырехгодичного проспективного исследования в подгруппу А с благоприятным течением ИБС (если в течение всего периода наблюдения на фоне адекватно проводимой терапии сохранялось стабильное состояние гемодинамических показателей пациента) включены 27 пациентов, а именно: 19 человек (76,0%) из группы ХСН без СД2 и 8 человек (40,0%) из группы ХСН в сочетании с СД2. В подгруппу Б с неблагоприятным течением ИБС (госпитализации по поводу ХСН более 1 раза на протяжении всего периода наблюдения, летальность либо другие неблагоприятные клинические события) вошли 18 пациентов: 6 больных из группы ХСН без СД2 (26,1%) и 12 человек (60,0%) — из группы ХСН в сочетании с СД2. В однофакторном анализе наиболее прогностически неблагоприятными факторами оказались: низкий уровень ПЭК и высокий уровень эндотелина-1, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 9 и 6 раз, соответственно; высокий уровень НУП, выраженность диастолической дисфункции левого желудочка по соотношению  $E/e'$  — в меньшей степени, но также статистически значимо ассоциировались с неблагоприятным течением ИБС и ХСН. В многофакторном анализе только низкий уровень ПЭК сохранял высокую прогностическую значимость, увеличивая риск неблагоприятного течения ИБС в 8 раз ( $p = 0,022$ ), что может отражать снижение репаративного потенциала клеток сосудов, усугубляя сосудистые нарушения и отягощая течение ХСН и ИБС в целом. Несмотря на то, что представленная модель прогноза вероятности неблагоприятного течения ИБС построена на небольшой выборке больных ХСН и небольшом количестве сердечно-сосудистых событий за весь период проспективного наблюдения, тем не менее, многофакторный анализ, включающий только уровень ПЭК и уровень эндотелина-1 свидетельствует, что оба этих показателя сопоставимо увеличивают риск неблагоприятного течения ИБС и ХСН в 7,4 и 6,8 раза, соответственно ( $\chi^2 = 19,9$ ;  $p = 0,0009$ ), что, безусловно, нуждается в уточнении на большей выборке больных.

**Кочкина А.В.<sup>1,2</sup>, Темнов А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тюльский государственный университет»

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН»  
a-kochkina@rambler.ru

**ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 И ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ТРАВМАХ**

В работе проводилось экспериментальное исследование по оценке эффективности влияния препаратов на основе пероксиредоксина 6 (Prx 6) и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на процесс заживления ран, вызванных механическим повреждением и химическим ожогом.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования были проведены на белых крысах-самцах линии Wistar. Моделирование раневого процесса проводилось под общим наркозом. Механическое повреждение кожи предусматривало иссечение полнослойного кожного лоскута до фасции. Также производилось вшивание под кожу интактной области пластикового кольца для предотвращения контракции краевого эпителия. Контактный химический ожог создавали пропитанной в 40% трихлоруксусной кислоте фильтровальной бумагой, после чего место нанесения ожога промывалось проточной водой. Для оценки эффективности влияния исследуемых раневых препаратов на процесс заживления ран животных разделили на 4 группы: контрольная группа — физиологический раствор, 1-я группа — Prx 6, 2-я группа — кондиционированная среда, содержащая паракринные факторы МСК (кМСК), 3-я группа — кМСК + Prx 6. Динамику заживления ран оценивали с помощью визуального, гистологического, иммуногистохимического методов, оценку уровня поражения клеток и степень патологических процессов — по уровню цитокинов и маркеров апоптоза методом иммуноферментного анализа, оценку антиоксидантного статуса в ожоге — по степени перекисного окисления.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Исследование модели механической кожной раны и её лечения показало, что созревание грануляционной ткани в экспериментальных группах происходит быстрее, чем в контрольной. Ткань выглядит более зрелой, особенно через 28 сут. после нанесения повреждения. Индекс созревания грануляционной ткани (отношение удельного количества фибробластов и фиброцитов к количеству клеток в единице площади препарата) указывает, что наилучший эффект наблюдается при использовании кМСК. Применение Prx 6 улучшало васкуляризацию грануляционной ткани через 14 и 28 сут., что свидетельствует о благоприятном действии данного фермента на заживление ран. Наилучший эффект наблюдается в первые дни, что, по-видимому, связано с нейтрализацией окислительного стресса. Использование кондиционированной среды увеличивало процентное содержание фибробластов в ране и тем самым ускоряло процесс созревания грануляционной ткани. Исследование процессов регенерации ран, вызванных химическим ожогом, показало, что в группе с препаратом Prx 6 и кМСК активнее всего проходят процессы клеточной пролиферации и заживления ткани. Общий уровень цитокинов, стимулирующих воспаление, в

данной группе снижен. Таким образом, совместное использование пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток вызывает наилучший терапевтический эффект, ускоряя процесс заживления раневых дефектов кожи различной этиологии.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-44-500371 p\_a.*

**Кошелева Н.В.<sup>1,2</sup>, Сабурова И.Н.<sup>1,3</sup>, Ильина И.В.<sup>4</sup>, Зурина И.М.<sup>1</sup>, Горкун А.А.<sup>1</sup>, Колокольцова Т.Д.<sup>1,3</sup>, Ситников Д.С.<sup>4</sup>, Овчинников А.В.<sup>4</sup>, Агранат М.Б.<sup>4</sup>, Репин В.С.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

<sup>4</sup> ФГБУН «Объединенный институт высоких температур» РАН  
n\_kosheleva@mail.ru

**НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ IN VITRO НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ**

Направленные на восстановление повреждений процессы регенерации и репарации происходят на всех уровнях организации — клеточном, тканевом, органном, организменном. Процессы репарации активно изучают на различных модельных системах как in vivo на животных, так и in vitro. Клеточные культуры — это одна из простейших моделей в системе in vitro. Культивирование в трехмерных системах позволяет поддерживать физиологические свойства и пролиферативную активность клеток в условиях, приближенных к in vivo. Целью исследования стало создание новой доступной воспроизводимой модели для изучения процессов репарации in vitro с использованием клеточных сфероидов и современных методов лазерной микрохирургии. Исследование проведено на сфероиде из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и из дермальных фибробластов (ФБ) человека. Сфероиды получали на агарозных планшетах с лунками (Microtissue, США) и повреждали наносекундным лазерным диссектором PalmCombiSystem (Zeiss, Германия). Параметры лазерного излучения (длина волны 355 нм, частота импульсов 100 Гц, длительность импульсов 2 нс, максимальная энергия в импульсе 9 мкДж, время воздействия 10–30 с.) оптимизировали для эффективной микродиссекции заданной области поверхностной и внутренней зон сфероида. Наблюдение за процессом репарации проводили, используя прижизненную цейтраферную фотосъемку в системе Cell-iQ (CM Technologies, Финляндия). Через 1, 6, 24, 72 и 168 часов сфероиды анализировали с применением методов световой, флуоресцентной и растровой электронной микроскопии. За 7 сут. в 3D культуре ММСК и ФБ формировали жизнеспособные плотные сфероиды. В составе сфероидов выделяли две области — 2–4 слоя поверхностных уплотненных плотно прилегающих друг к другу клеток и внутренняя зона с полигональными клетками и внеклеточным матриксом. В течение 3 мин. после воздействия лазерных импульсов наблюдали спонтанное раскрытие краев разреза на угол более



180°. Повреждение вызывало гибель клеток в месте разреза, нарушалась исходная структура сфероидов, форма клеток раневой поверхности менялась с вытянутой уплощенной на округлую. В незатронутой повреждением части сфероидов сохранялось строение с уплощенными поверхностными клетками и полигональными клетками внутренней зоны. Через сутки наблюдали частичное восстановление сфероидов, клетки в поверхностных слоях начинали расплываться. Восстановление исходной структуры сфероидов с характерными несколькими поверхностными слоями уплощенными черепицеобразно расположенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны происходило без пролиферации через 7 сут. после микродиссекции за счет перестройки выживших клеток. Разработанная модель повреждения клеточных сфероидов с применением лазерной микродиссекцией открывает новые возможности для изучения механизмов регенерации и репарации *in vitro*.

**Кошелева Н.В.<sup>1,2</sup>, Зурина И.М.<sup>2</sup>, Горкун А.А.<sup>2</sup>, Устинова Е.Е.<sup>2</sup>, Сабурова И.Н.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Биологический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ Общей патологии  
и патофизиологии»

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская  
академия непрерывного профессионального  
образования» Минздрава России  
n\_kosheleva@mail.ru

### **МОДЕЛЬ «ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЕРДЦА» НА ОСНОВЕ ЭКСПЛАНТАЦИОННОЙ 3D КУЛЬТУРЫ МИОКАРДА**

Восстановление сократительной функции миокарда при заболеваниях сердца является одной из ключевых задач терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Как для тестирования биомедицинских и фармакологических препаратов, так и для разработки современных методов лечения с применением клеточных технологий нужны новые модели, в которых не только сохраняется цитоархитектоника миокарда, но и длительно поддерживается сократительная активность. Целью нашего исследования стало получение модели функционального миокарда в 3D культуре. Эксплантаты сердец плодов мыши 11,5–14,5 сут. развития культивировали 7–10 сут. в стандартных 2D условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Последующее 3D культивирование осуществляли в системе «висячая капля» в стандартных условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Через 1–3 мес. 3D культивирования к эксплантатам добавляли маркированную прижизненным флуоресцентным красителем Dil (In vitrogen, США) суспензию миобластов человека. Цейтраферную фоторегистрацию осуществляли на приборе Cell-IQ (ChipManTechnologies, Финляндия) с помощью программного обеспечения Cell-IQImager. Ультроструктурный анализ был проведен с применением просвечивающей электронной микроскопии. При культивировании эксплантатов в 2D условиях наблюдали неритмичные сокращения отдельных групп клеток, сократительная активность которых пропадала в первые 5–10 сут. Из эксплантатов на поверхность культурального пластика выселялись популяции разных типов клеток: кардиомиоциты, фибробластоподобные, а также гемопоэтические клетки. В результате, нарушалась нативная цитоархитектоника миокарда, целостность которой сохраня-

ет и поддерживает его функциональную активность. В неадгезивных 3D условиях ритмичные сокращения эксплантатов не угасали в течение полугода, то есть длительно сохранялось функциональное состояние ткани. При объединении в одном эксплантате двух водителей ритма аритмия исчезала уже через 7 сут. 3D культивирования. Добавление ксеногенных миобластов не повлияло на сократительную активность полученных 3D культур эксплантатов миокарда. Добавленные миобласты сохранялись в поверхностной области сокращающихся эксплантатов до 3 мес. В клетках поверхностной области таких эксплантатов с ксеногенным миобластами присутствовали многочисленные секреторные гранулы, межклеточные контакты и пучки микрофиламентов, характерные для предшественников кардиомиоцитов. Полученная и исследованная модель на основе эксплантационной 3D культуры миокарда позволяет длительно сохранить как цитоархитектонику ткани, так и ее функциональную активность, что открывает новые возможности комплексного изучения препаратов, влияющих на ритм сокращений, а также позволяет исследовать возможность восстановления ткани миокарда с помощью клеточных технологий. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).*

**Крашенинников М.Е., Абдуллаев Л.К.,  
Людуп А.В.**

Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Минздрава России  
krashen@rambler.ru

### **РАЗРАБОТКА ПЕРФУЗИОННОГО КЛЕТОЧНОГО БИОРЕАКТОРА ДЛЯ КОСМИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

Факторы космического полёта (ФКП) оказывают существенное влияние на состояние и свойства клеток млекопитающих за счет изменений физических условий и воздействие на культуральное окружение. Ранее в ходе эксперимента «МСК» в 2004–2008 гг. исследовалось влияние ФКП на состояние клеток различных популяций иммунной системы и стволовых клеток гемопоэтического ряда. При этом культивирование без замены питательной среды снижало жизнеспособность всех клеток. Были получены данные, свидетельствующие о трудностях перфузионного культивирования клеток млекопитающих в условиях отсутствия гравитации, которые, в частности, связаны с развивающейся гипоксией, образованием воздушных пузырей в культуральной жидкости, а также с нарушением массообмена между питательной жидкостью и клетками из-за отсутствия конвекции, что становилось причиной гибели клеток.

**ЦЕЛЬ.** Обеспечить условия эффективного культивирования мезенхимальных клеток костного мозга в условиях космического полета.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для устранения причин гибели клеток была разработана конструкция культуральной ячейки с капиллярами, проходящими через плотную гелеобразную структуру, в которой равномерно фиксированы живые клетки. Такая конструкция исключает возможность образования воздушных

пузырей, как в капиллярах, так и в пространстве вокруг капилляров, в котором находятся клетки.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Разработаны требования и изготовлена модель биореактора для культивирования клеток в условиях микрогравитации при проведении космического эксперимента, и требования к проведению космического эксперимента. Предложена конструкция двухпотоковой культуральной ячейки (культиватора клеток) и способ жизнеобеспечения культивируемых клеток, который должен обеспечивать жизнеспособность этих клеток. Получена лицензия на космическую деятельность для проведения эксперимента на Международной космической станции.

**ВЫВОДЫ.** Разработанные технологии и конструкционные решения биореактора являются основанием для получения клеток млекопитающих, использование которых возможно в условиях космического полета для задач регенеративной медицины.

**Крещенко Н.Д.**

ФГБУН «Институт биофизики клетки» РАН  
nkreshch@rambler.ru

### **ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАНАРИЙ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ**

Свободноживущие черви, планарии, широко используются в российских и зарубежных лабораториях в качестве биологического объекта. Они обладают непревзойденной регенерационной способностью, выделяющей их среди других животных. Планарии могут восстанавливать целый организм из небольшого фрагмента тела. Регенерация обеспечивается стволовыми клетками — необластами, сохраняющими свойства эмбриональности во взрослом организме. Эти клетки являются древнейшими стволовыми клетками в животном царстве, дающими начало всем типам клеток в ходе ежедневного клеточного самообновления, после повреждения они способны дифференцироваться также и в половые клетки. Работа посвящена количественной оценке пролиферирующих необластов в организме планарий *Girardiaticrina* в ходе регенерационного процесса. Изменение уровня пролиферации необластов регистрировали, оценивая величину митотического индекса в окрашенной (Noechst 33342) суспензии клеток, приготовленной из тканей планарий, или изучая тотальные препараты планарий, окрашенные иммуноцитохимическим методом с помощью специфических антител к фосфорилированным H3-гистонам и вторичных флуоресцентно-меченных иммуноглобулинов (CF488A, Biotium). Распределение флуоресценции — индикатора пролиферативного процесса, анализировали с помощью флуоресцентного (LeicaDM600) и конфокального лазерного сканирующего (LeicaTCSSP5) микроскопов. Оценивали количество клеток на единицу площади тела планарии. Специфическую окраску наблюдали в крупных и более мелких клетках с округлыми или овальными ядрами диаметром 8.6—11.4  $\mu\text{m}$ . У интактных планарий стволовые клетки распределены по всему телу в паренхиме, между разветвлениями слепого кишечника. Глотка, расположенная в центре тела, не содержала необластов. Количество меченых клеток варьировало у разных особей ( $111.5 \pm 5.7$ ,  $n = 8$ ). У регенерирующих планарий число флуоресцентно меченых клеток увеличивалось в ходе регенерационного процесса. Уже через 1 ч. после

отсечения фрагмента тела число пролиферирующих клеток достоверно увеличивалось ( $198.3 \pm 17.3$ ,  $n = 11$ ). Более существенное возрастание числа митотических клеток происходило к 8ч регенерации ( $349.5 \pm 33.8$ ,  $n = 7$ ), затем к 24 ч. ( $383.3 \pm 19.9$ ,  $n = 7$ ), затем число митозов к 48ч немного уменьшалось ( $307.0 \pm 24.4$ ,  $n = 9$ ). Специфический для плоских червей нейропептид NPF (PDKDFIVNPSDLVLDNKAALRDYLRQINEYFAIIGRPRF), добавляли в среду содержания планарий *G. tigrina* сразу после удаления головного конца. Нейропептид (10-6M и 10-7M) стимулировал пролиферативную активность клеток у планарий в ходе регенерации. Наиболее выраженный эффект наблюдали через 4, 12 и 24 ч. после декапитации ( $P < 0.05$ ). Эффект варьировал в диапазоне 120—160% от контрольных значений. Ранний эффект пептида может указывать на стимуляцию необластов, находившихся в G2-фазе клеточного цикла, к выходу в митоз. Использование планарий, как простых биологических моделей, имеет ряд преимуществ: их добытие и содержание доступны по материальным соображениям, на них возможна постановка множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику. Проводимые исследования позволят идентифицировать универсальные механизмы, осуществляющие запуск, реализацию, и регуляцию репаративных процессов не только у планарий, но и у высших животных и человека. При этом можно вспомнить слова основоположника молекулярной биологии Уотсона: «Что верно для *E. coli*, то верно и для слона».

Финансирование исследования: РФФИ 15-04-05948a.

**Кривенцов А.В.<sup>1</sup>, Александров В.Н.<sup>2</sup>,  
Михайлова Е.В.<sup>2</sup>, Попрядухн П.В.<sup>3</sup>, Юдин В.Е.<sup>3</sup>,  
Сидорин В.С.<sup>4</sup>, Хубулава Г.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова»

<sup>2</sup> ФГБОУ «Санкт-Петербургский педиатрический медицинский университет» Минздрава России

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого

<sup>4</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН  
sascha\_jiembet@mail.ru

### **ГИБРИДНЫЙ ПРОТЕЗ, КАК ВОЗМОЖНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА ПРОТЕЗОВ ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ АОРТЫ И БИОРЕЗОРБИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Известны сосудистые протезы из биологического материала (ауто-, алло- и ксенопластического). Аутогенные протезы в 15—30% случаев имеют неустраняемые недостатки (варикоз вен, атеросклероз артерий) и крайне неудовлетворительные результаты в отдаленный период, а использование алло- и ксеногенных протезов невозможно без пожизненной иммуносупрессивной терапии. Протезы с внутренним антитромбогенным покрытием не решают проблемы осложнений, возникающих в отдаленные сроки, так как атромбогенное покрытие уместно лишь в составе плотных (вязаных или плетеных) протезов, ограничивающих «вживление» протеза в ткани организма, провоцируя отдаленные осложнения. В этой связи заслуживают внимание протезы из децеллюляризированной ткани (ДЦТ) сосуда и биорезорбируемого материала, равно способные к интеграции с тканями реципиента и эндотелизации, как

условию, казалось необходимому для профилактики тромбоза и формированию собственного матрикса сосуда *de novo*. В этом контексте на крысах-самцах Wistar массой до 150 г — реципиентах протезов из ДЦТ аорты ( $n = 10$ ) и реципиентах протезов из биорезорбируемого материала поли L-лактида ( $n = 10$ ) провели исследования регенерации сосуда в динамике посттрансплантационного периода. Оба типа протезов оказались несостоятельными: протез из ДЦТ — спустя 1 мес. после трансплантации, а протез из L-полилактида — спустя 8 мес. Основной причиной гибели животных была острая кровопотеря из-за разрыва аневризмы протеза, сформировавшейся вследствие механической недостаточности протеза. При оценке состояния протезов погибших животных микроскопически наблюдали признаки формирования нового сосуда: образование интимы и средней оболочки, но очень слабо выраженной — редких неупорядоченных эластических волокон и гладких миоцитов. Полученные результаты позволили выдвинуть предположение о возможной достаточности гибридного, биосинтетического протеза, включающего два слоя: слоя из биорезорбируемого материала и второго из ДЦТ, способных придать механическую прочность протезу, сохранив иницирующие репаративную регенерацию свойства внеклеточного матрикса ДЦТ. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-33-00003).

Финансирование исследования: 1) ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» 2) ФГБОУ СПбГПМУ Минздрава России, Санкт-Петербург.

**Кручинина А.Д., Венедиктов А.А.**

КАРДИОПЛАНТ

a.d.kruchinina@mail.ru

### **ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ КОЛЛАГЕНОВЫЙ МАТРИКС КАК МАТЕРИАЛ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

В регенеративной медицине для восстановления целостности и функциональной активности тканей и органов широкое применение находят тканеинженерные конструкции. Они состоят из клеток, формирующих внеклеточный матрикс, биodeградируемого носителя для трансплантации клеток и биоактивных молекул (цитокины, факторы роста и т.д.), способствующих активному восстановлению поврежденной ткани. В связи с этим разработка подходящего носителя для культур клеток является одной из актуальных задач современной медицины. В качестве основных требований, предъявляемых к материалу, можно выделить способность к биodeградации, достаточную механическую прочность, хорошую адгезию и рост клеточных культур на нём, безопасность продуктов деградации, отсутствие иммунного ответа. Группой инженеров ООО «Кардиоплант» (г. Пенза), была разработана технология обработки биологического сырья с целью получения внеклеточного коллагенового матрикса, с достаточной механической прочностью и толщиной от 0,02 до 0,2 мм, удовлетворяющего всем перечисленным требованиям. Процесс изготовления внеклеточного коллагенового матрикса включает в себя химико-ферментативную обработку для разрушения клеток как основных факторов иммуногенности, стабилизацию сшивающим агентом для улучшения физико-механических характеристик материала, лиофилизацию одно-

слойных или многослойных тканевых конструктов. Пространственную архитектуру и механические характеристики биоматериала определяют нерастворимые фибриллярные белки. Основу составляют коллагеновые волокна типа I, небольшие количества эластина и коллагена типов III, IV и VI. Фибринонектин и ламинин опосредуют клеточную адгезию. Растворимые глобулярные белки цитокины, факторы роста, матриксные металлопротеиназы, связанные со структурными белками в составе подслизистой тонкой кишки свиньи определяют биологическую активность, играют важную роль в клеточной сигнализации, ремоделировании биоматериала в организме реципиента. Гликозаминогликаны и протеоглики обеспечивают связывание клеток и факторов роста, усиливают миграцию клеток к поврежденной ткани, стимулируют ангиогенез, клеточную дифференциацию и пролиферацию, регулируют пространственную структуру внеклеточного коллагенового матрикса за счет контроля размера и ориентации коллагеновых волокон. Наличие в материале пор от 20 до 30 мкм способствует диффузии кислорода, необходимого для пролиферации и поддержания жизнеспособности клеток. Исследования на культурах диплоидных фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека показали отсутствие цитотоксичности материала, высокую митотическую активность и прирост количества клеток культур. Имплантация биоматериала свидетельствует об отсутствии выраженной воспалительной реакции, о высокой скорости замещения собственными тканями реципиента без признаков рубцевания. Полученный материал может найти широкое применение в различных областях медицины, в связи с этим актуальным является изучение функциональных свойств изделий на основе этого материала.

**Михайличенко В.Ю.<sup>1</sup>, Кубышкин А.В.<sup>1</sup>, Фомочкина И.И.<sup>1</sup>, Токавин А.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»,  
Медицинская академия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»

Kubyshkin\_av@mail.ru

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА**

Среди разрабатываемых методов лечения инфаркта миокарда (ИМ) одним из самых перспективных можно считать использование трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Однако механизмы влияния мультипотентных стволовых клеток на регенерацию тканей остаются не до конца изученными, а данные о характере и путях их дифференцировки во многих случаях противоречивыми. Эксперименты проведены на 150 шестимесячных крысах линии Вистар-Киото массой  $302,4 \pm 13,2$ . Моделирование ИМ выполнялось на 90 крысах самках, которым для трансплантации использовали ММСК из костного мозга самцов, что позволило идентифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента с помощью Y-хромосомы. Животные были раз-

делены на 5 экспериментальных групп: 1 группа (n = 15) контрольная – интактные животные; 2 группа (n = 30) – крысы с торакотомией; 3 группа (n = 30) – крысы, которым выполнялось хирургическое моделирование ИМ без последующих лечебных манипуляций; 4 группа (n = 30) – крысы, которым после моделирования ИМ выполняли трансплантацию ММСК; 5 группа (n = 30) – крысы, которым после моделирования ИМ выполняли трансплантацию коммитированных ММСК (кММСК). В качестве доноров были отобраны 15 здоровых крыс самцов, которых было достаточно для культивирования необходимого количества ММСК. Формирование ИМ у крыс подтверждалось макроскопически во время выполнения перевязки коронарной артерии, по данным ЭКГ, УЗИ, а также по выводу животных из опыта при патоморфологическом исследовании. Всем животным проводилось исследование уровня суммарной концентрации нитрат и нитрит ионов, а также уровня ЭТ-1, VEGF и FGF в сыворотке крови методом ИФА. Кроме того, выполнялось окрашивание ткани миокарда иммуногистохимическими методами для выявления актина, тропинина и пролиферирующих клеток. Для детекции введенных ММСК самцов использовали гибридизацию *in situ* с определением Y-хромосомы. Культивирование ММСК проводили в лаборатории клеточных и тканевых культур Института экстренной и восстановительной хирургии им. В. Гусака (Донецк) по стандартной методике. Фенотип клеток (положительные для CD90 и SSEA-1; отрицательные для CD34, CD45, CD117) определялся проточной цитофлюориметрией. Коммитированные ММСК в кардиомиоцитарном направлении получали путем добавления в культуральную среду 5-азациитидина в концентрации 6 мкМ/л на 24 ч. Культуры клеток вводились крысам 4 и 5 групп в бедренную вену из расчета 1,0 млн клеток на 1 животное. В результате проведенных исследований с помощью реакции гибридизации с Y-хромосомой показан «хоуминг»-эффект ММСК в зону ИМ и их дифференцировка в клетки эндотелия и фибробласты. Причем трансплантация ММСК при ИМ у крыс приводит к 6-кратному увеличению среднего количества сосудов на 100 000 мкм<sup>2</sup> и сопровождается 3-кратным повышением концентрации VEGF к концу 24 ч. опыта. Эффективность ангиогенеза подтверждается возрастанием концентрации оксида азота, VEGF, FGF, а также снижением содержания ЭТ-1. Улучшение васкуляризации зоны ишемии примерно в равной степени отмечено как при трансплантации кММСК, так и не коммитированных клеток, что сопровождается морфофункциональным восстановлением гибернирующего миокарда, значительным уменьшением зоны ИМ и улучшением показателей фракции выброса левого желудочка. По нашим данным основной эффект трансплантации ММСК заключается в стимуляции неоваскулогенеза и паракринном влиянии на поврежденный миокард.

**Кувда Е.В., Губарева Е.А., Гуменюк И.С., Сотниченко А.С., Накохов Р.З.**

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
elenakuevda@yandex.ru*

### **ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ**

Динамическое развитие регенеративной медицины требует разработки как методов создания биологических каркасов, так и клеточных технологий для их рецеллюляризации. Первая проблема может быть довольно успешно решена с применением методов децеллюляризации, в то время как выбор оптимальных клеточных ресурсов для репопуляризации биологических каркасов остается ограниченным. Широко используемые на настоящий момент мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), эпителиальные и эндотелиальные клетки, к сожалению, не всегда в полной мере обеспечивают рецеллюляризацию матриксов, что оставляет простор для поиска и изучения новых клеточных ресурсов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование возможностей рецеллюляризации биологических каркасов различными клеточными линиями проведено на 40 крысах-самцах линии Wistar при соблюдении надлежащих этических норм. Биологические каркасы легких, диафрагмы и пищевода были получены путем децеллюляризации детергент-энзиматическим методом с последующей оценкой качества матрикса при проведении гистологических, биомеханических исследований и количественного определения резидуальной ДНК. Выделение костного мозга и жировой ткани для получения ММСК костно-мозгового происхождения (ММСК-КМ) и стромально-васкулярной фракции (ММСК-СВФ) осуществляли стандартными методами. Сокультуры клеток из нативных диафрагмы и легких крыс, полученные путем гомогенизации и последующего ферментативного выделения, также были изучены в качестве потенциального ресурса для рецеллюляризации биологических матриксов. Все культуры клеток были верифицированы на принадлежность к ММСК при оценке экспрессии поверхностных маркеров CD 34, CD 45, CD 90, CD 105 и при проведении индуцированной дифференцировки в три клеточных линии с качественной и количественной оценкой. Пролиферативную активность клеток оценивали путем регистрации положительно окрашивания Ki-67 и CD 71 при цитохимическом исследовании. Для культур клеток из гомогенатов нативных тканей были дополнительно проведены цитохимические исследования на определение экспрессии виментина, цитокератина-5,  $\beta$ III-тубулина, VEGF и десмина. Жизнеспособность клеток при рецеллюляризации матриксов, а также цитотоксичность биологических каркасов оценивали при проведении ХТТ и Alamarblue тестов с последующим количественным расчетом показателей в процентах.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Как ММСК-КМ, так и ММСК-СВФ положительно окрашивались на содержание маркеров CD 90, CD 105, негативно – на содержание CD 34 и CD 45, при этом ММСК-СВФ более интенсивно окрашивались Oil Red O. В культурах клеток из гомогенатов нативной ткани легких и диафрагмы накопление Oil Red O было практически одинаковым, однако, клетки из гомогенизированной ткани

диафрагмы в большей степени были склонны к формированию многослойных узлов, окрашивающихся ализариновым красным. Проллиферативная активность клеточных культур существенных отличий не имела. Жизнеспособность клеток, полученных при гомогенизации нативных тканей легких и диафрагмы и заселенных на каркасы, составили 75,31% и 57,18% соответственно. В то же время ММСК-СВФ продемонстрировали низкую метаболическую активность и способность к выживанию при заселении ими ацеллюлярных матриксов диафрагмы по сравнению с пищеводом — 3,6% и 27,9%. Таким образом, выбор клеточных ресурсов для заселения биологических матриксов должен осуществляться с учетом как особенностей клеточных культур и источников их получения, так и цитотоксических свойств самих рецеллюляризованных каркасов.

Финансирование исследования: *Комплексная НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоральных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».*

#### **Кузин С.М.<sup>1</sup>, Стукалов С.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
<sup>2</sup> Медико-генетический научный центр  
smkuzin@mail.ru

#### **ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ОБНОВЛЯЮЩИХСЯ ТКАНЯХ**

Генетическая нестабильность и связанный с этим риск развития онкологических заболеваний являются одной из основных причин, ограничивающих применение стволовых клеток. Механизмы, поддерживающие относительную генетическую стабильность клеточной популяции в организме, и нарушающиеся при извлечении клеток и их культивировании остаются во многом непонятными.

**ЦЕЛЬ.** Изучение механизмов генетического гомеостаза в обновляющихся тканях в норме и после мутагенного воздействия.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследовали клетки красного костного мозга джунгарских хомячков и лимфоциты периферической крови кроликов и макак-резусов. В качестве мутагена применяли тиофосфамид в дозах 1,5–6 мг на кг массы тела (в разных экспериментах). Клетки забирали в сроки от нескольких часов до 6 мес. после мутагенного воздействия. На цитогенетических препаратах определяли долю клеток с хромосомными aberrациями, количество разрывов хромосом в aberrантных клетках, сестринские хроматидные обмены.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Примененные дозы тиофосфамида вызывают сильный мутагенный эффект в первые сутки после воздействия. Доля клеток с хромосомными aberrациями увеличивалась в 10–30 раз по сравнению с контролем, при этом значительная часть клеток имела множественные aberrации. После детоксикации и выведения алкилирующих мутагенных метаболитов начинается элиминация мутантных клеток и восстановление генетического гомеостаза. Закономерности восстановления генетической стабильности существенно различаются в популяциях быстро обновляющихся клеток красного костного мозга и лимфоцитов периферической крови. В костном мозге хомячков уже через 36–38 ч.

доля клеток с хромосомными aberrациями снижается с 30% до 3,5% (в контроле — 1%). В лимфоцитах крови обезьян даже через 6 мес. сохраняется повышенный уровень aberrантных клеток. Анализ полученных данных показал, что элиминация клеток с генетическими нарушениями возможна при действии двух основных механизмов. Механизм контрольных точек эффективно действует в течение первых 2 сут. после мутагенного воздействия, позволяя за 1–2 митотических цикла посредством апоптоза удалить наиболее поврежденные клетки. Механизм перевода в дифференцировку способен постепенно элиминировать менее поврежденные клетки, которые могут преодолевать контрольные точки и многократно делиться. Дифференцирующиеся мутантные стволовые клетки костного мозга покидают свою нишу и выходят в кровь, а их замещают клетки без значительных генетических нарушений, в которых прошла эффективная репарация. Данный механизм генетического гомеостаза может эффективно действовать только в организме. Его нарушение может быть одной из причин нарастания генетической нестабильности в культурах стволовых клеток.

#### **Кузнецова Д.С.<sup>1</sup>, Проданец Н.Н.<sup>1</sup>, Тимашев П.С.<sup>2</sup>, Баграташвили В.Н.<sup>3</sup>, Загайнова Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

<sup>3</sup> ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Институт фотонных технологий РАН  
daria.s.kuznetsova@gmail.com

#### **РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С МСК. РОЛЬ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК**

Развивающейся стратегией устранения костных дефектов в тканевой инженерии является использование тканеинженерных конструкций с подсаженными клетками. Одними из наиболее перспективных клеточных популяций по-прежнему остаются мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Существует много исследований, показывающих улучшение костной регенерации при участии МСК, однако до сих пор остается открытым вопрос о том, насколько подсаженные клетки вовлечены в регенерацию собственной ткани. Таким образом, целью данной работы стало исследование участия подсаженных МСК в регенерации костной ткани *in vivo* на скаффолдах. МСК выделяли из костного мозга трансгенных C57/Bl6 мышей, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок GFP (GFP(+)) мыши), и из костного мозга C57/Bl6 мышей (GFP(-)) мыши). За три дня до имплантации клетки высевали на скаффолды, полученные одним из методов быстрого прототипирования — поверхностным селективным лазерным спеканием. С помощью стоматологического трепана у мышей формировали круглый дефект черепа. Эксперимент включал три группы животных. Первая группа состояла из GFP(-) мышей, которым были имплантированы скаффолды с GFP(+)-МСК. Во второй группе GFP(+) мышам внедряли скаффолды с GFP(-) МСК. Третья контрольная группа представляла собой GFP(+) мышей с пустым скаффолдом без подсаженных клеток. Такая перекрестная модель позволяла

четко разделить и визуализировать подсаженные и собственные клетки, а также понять, из каких клеток формируется костная ткань и кровеносные сосуды в месте дефекта. Через 6 нед. после операции на имплантатах были найдены подсаженные GFP(-) МСК и GFP(+)-МСК, при этом собственные МСК в месте дефекта не обнаруживались. Более того, изначально пустой скаффолд без подсаженных клеток так и оставался пустым. Морфологический анализ показал, что все скаффолды через 6 нед. сохраняли пористую структуру, значительная часть полимера скаффолда оставалась в неизменном виде. К 12 нед. на скаффолдах по-прежнему можно было видеть большое количество подсаженных GFP(-) МСК и GFP(+)-МСК. Важным является тот факт, что собственные клетки на скаффолдах в месте дефекта так же, как и через 6 нед., не обнаруживались. Скаффолды без подсаженных клеток оставались пустыми. Большая часть полимера скаффолдов с МСК резорбировалась, дефект заполнялся костной тканью. Кроме того, в месте дефекта на скаффолдах обнаруживалось большое количество сосудов, которые, предположительно, формировались также из подсаженных клеток. На скаффолдах с подсаженными GFP(+)-МСК в нефлуоресцентной мыши сосуды имели сильный флуоресцентный сигнал и, соответственно, состояли из GFP(+) клеток. И, напротив, на скаффолдах с GFP(-)-МСК в GFP(+) трансгенной мыши сосуды не флуоресцировали. Таким образом, показано, что подсаженные МСК в течение длительного времени способны сохранять свою активность на скаффолдах, а также непосредственно участвовать в образовании костной ткани и, предположительно, кровеносных сосудов в месте дефекта.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 13-02-12101 офи\_м.*

**Кукс Е.И., Шершакова Н.Н., Макарова Э.А., Андреев С.М., Хаитов М.Р.**

ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России  
el.kuks@yandex.ru

#### **ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ФУЛЛЕРЕНА СТИМУЛИРОВАТЬ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖНЫХ ПОРАЖЕНИЙ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Процесс регенерации поврежденной кожной ткани является сложнейшим биологическим процессом и остается актуальной медицинской проблемой во всем мире. При раневых поражениях, включая ожоги, нарастает активность окислительных реакций, приводя к истощению антиоксидантной защиты. Фуллерен C60 является мощным электронным акцептором, способным *in vivo* и *in vitro* эффективно инактивировать активные формы кислорода и свободные радикалы, что обуславливает его перспективность как основы лечебных препаратов для заживления кожных повреждений.

**ЦЕЛЬ.** Изучение способности водорастворимой формы C60 влиять на регенеративные процессы в кожной ткани мышей.

**МЕТОДЫ.** Препарат в форме водного раствора фуллерена (ВРФ) получали диализным методом, разработанным нами ранее. Для моделирования химического ожогового воспаления кожного покрова применяли NaOH (12,5 н.) и 99,5% уксусную кислоту. ВРФ наносили ежедневно в течение 14 дней

мышам BALB/c, подвергшимся щелочному ожогу и 18 дней мышам с кислотным ожогом. Для моделирования раневого поражения кожного покрова проводили иссечение кожного покрова на спине мышей. При этом терапевтическую обработку кожных ран начинали на следующий день после иссечения кожи и продолжали в течение 11 дней. Оценка способности фуллерена C60 влиять на уровень экспрессии генов проводилась методом ПЦР-РВ. Для визуального определения ранозаживляющей эффективности проводили измерение площадей раневой поверхности. Результаты. Эксперименты показали, что нанесение фуллерена C60 приводило к ускорению процесса заживления, как при раневом поражении, так и при ожоге NaOH. У мышей, получавших фуллерен, увеличивалась экспрессия генов HMGb1 и VEGF-A, что может свидетельствовать о наличии активного регенеративного процесса в коже. У животных также наблюдалось подавление экспрессии генов TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, ответственных за поддержания процесса воспаления. Кроме того, гистологические анализы, особенно при моделировании щелочного ожога, подтверждали заметное улучшение состояния кожного покрова.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что фуллерен C60 в форме водного раствора обладает противовоспалительной активностью и способен стимулировать регенеративные процессы в коже при раневых и химических поражениях.

**Степанова А.В.<sup>1</sup>, Кочегура Т.Н.<sup>2</sup>,  
Ефименко А.Ю.<sup>3</sup>, Шестакова Е.А.<sup>4</sup>,  
Скляник И.А.<sup>4</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Медицинский научно-образовательный центр  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины,  
Медицинский научно-образовательный центр  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ФГБУ «Эндокринологический научный центр»  
Минздрава России  
konstantin-kuleb@mail.ru

#### **ИЗМЕНЕНИЕ АДИПОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ**

На настоящий момент в литературе описано снижение пролиферативного потенциала и изменение биологических свойств мезенхимных стромальных клеток (МСК) при хронических заболеваниях. Однако недостаточно охарактеризованы особенности изменения МСК при метаболических и эндокринных нарушениях, в частности таких, как инсулинорезистентность (ИР), которая является важным фактором в патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД2) и его связи с ожирением. По данным многих научных исследований функциональная активность МСК, выделенных из жировой ткани и костного мозга пациентов с длительным течением СД2 и плохо контролируемым показателями гликемии, значительно снижена. В нашей лаборатории было обнаружено, что количество циркулирующих прогениторных клеток в периферической крови больных ишемической болезнью сердца, сочетающейся с СД2, коррелирует с уровнем гипергликемии и степенью декомпенсации

нарушений углеводного обмена. Кроме того, при культивировании МСК в условиях высокой концентрации глюкозы (25 мМ) изменяется уровень экспрессии генов факторов, регулирующих ангиогенез, снижается способность МСК стимулировать рост новых сосудов. Таким образом, более подробное изучение особенностей влияния ИР на адипогенную дифференцировку МСК позволит лучше понять патогенез прогрессирования СД2 и роль МСК в этом процессе. Целью настоящей работы является изучение адипогенного потенциала МСК жировой ткани, полученных от пациентов с ИР. Степень ИР у пациентов оценивалась методом гиперинсулинемического-эугликемического клэмпса. МСК, выделенные по стандартному протоколу, подвергались дифференцировке в адипогенном направлении. ИР МСК была подтверждена снижением фосфорилирования протеинкиназы Б в ответ на стимуляцию инсулином. Оценка эффективности дифференцировки проводилась в динамике с помощью методов ПЦР в реальном времени по генетическим маркерам (PPARG, C/EBP $\beta$ , Adiponectin) и морфологического окрашивания липидных капель (OilRedO). В результате нами было показано, что ИР значительно изменяет дифференцировочный потенциал МСК в адипогенном направлении. При цитохимическом окрашивании в формирующихся адипоцитах из МСК, полученных от здоровых доноров, наблюдается равномерное распределение мелких липидных капель в большинстве клеток, в отличие от адипоцитов, полученных от доноров с ИР, которые формируют кластеры клеток с крупными липидными каплями, окруженные недифференцированными клетками, лишенными липидных включений. В то же время, данные ПЦР демонстрируют значительно более высокую экспрессию адипогенных факторов в МСК от пациентов с ИР. Полученные результаты позволяют предположить, что при развитии инсулиновой резистентности происходит снижение адипогенного потенциала МСК, сопряженное с усилением накопления липидных капель в дифференцирующихся клетках.

Финансирование исследования: *Исследования выполнены за счет гранта РФФИ № 14-35-00026 и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Дыйканов Д.Т.<sup>1</sup>, Кулебякина М.А.<sup>1</sup>,  
Кулебякин К.Ю.<sup>1</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>1</sup>, Семина Е.В.<sup>2</sup>,  
Ткачук В.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
surina.mary@gmail.com

#### **ВЛИЯНИЕ УРОКИНАЗЫ И УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ IN VIVO**

Система активаторов плазминогена урокиназного типа, или урокиназная система, включает в себя сериновую протеазу урокиназу (uPA), урокиназный рецептор (uPAR) и ингибиторы (PAI1 и PAI2). Урокиназная система осуществляет запуск каскадов внеклеточного протеолиза и внутриклеточной сигнализации, опосредуя миграцию, пролиферацию

и выживаемость клеток. В нескольких работах была показана важная роль урокиназной системы в регуляции адаптивного иммунного ответа, в частности, в регуляции активности Т-хелперных лимфоцитов первого (Gyetkoetal 2002, PMID:11777975) и второго (Gyetkoetal 2004, PMID:14688127) типов, а также в активации регуляторных Т-лимфоцитов (Heetal 2012, PMID:23169000). Несмотря на эти данные, молекулярные механизмы участия uPA и uPAR в регуляции иммунного ответа до конца не изучены; кроме того, недостаточно данных о влиянии uPA и uPAR на цитотоксические (CD8+) Т-лимфоциты, которые обеспечивают клеточный цитотоксический иммунный ответ, а также участвуют в патогенезе посттрансплантационных осложнений и аутоиммунных заболеваний. Целью данной работы стала оценка влияния uPA и uPAR на функционирование CD8+ лимфоцитов мыши. В работе использовали мышей нескольких линий: нокаутированных по гену урокиназного рецептора (линия uPAR-KO), нокаутированных по гену урокиназы (линия uPA-KO), а также линии мышей дикого типа (WT). Суспензию белых клеток селезенки получали по стандартному протоколу, после чего окрашивали с использованием антител, специфичных к CD8 $\alpha$ . Анализ окрашивания проводили методом проточной цитометрии. Оценка уровня экспрессии CTLA-4 (молекулы, экспрессируемой активированными Т-лимфоцитами и ингибирующей их пролиферацию) на уровне мРНК осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого CD8+ лимфоциты выделяли из суспензии белых клеток селезенки на клеточном сортере (FACS Aria, BDBiosystems), после чего из CD8+ лимфоцитов выделяли тотальную РНК. Нами было обнаружено, что у uPAR-KO мышей (в возрасте 8 нед.) наблюдается повышенное содержание CD8+ клеток в селезенке по сравнению с мышами дикого типа (9,84±0,2 млн у uPAR-KO, 4,07±0,28 млн у WT). Однако в более молодом возрасте (2 нед.) содержание CD8+ клеток у животных дикого типа и uPAR-KO мышей статистически не различается (0,75±0,06 млн у uPAR-KO, 0,82±0,14 млн у WT). Анализ содержания мРНК Ctla4 показал, что у uPAR-KO мышей (в возрасте 8 нед.) его экспрессия в 2,9 раза ниже по сравнению с мышами WT. У uPA-KO мышей в возрасте 8 недель также наблюдается повышенное содержание CD8+ лимфоцитов по сравнению с контрольными животными (5,72±0,89 млн у uPA-KO, 1,46±0,44 млн у WT). Экспрессия гена Ctla4 в субпопуляции CD8+ лимфоцитов у uPA-KO мышей по сравнению с WT мышами также снижена в 4,04 раза. Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие экспрессии урокиназы и урокиназного рецептора повышают пролиферацию CD8+ Т-лимфоцитов. В обоих случаях это происходит по механизму, связанному с изменением уровня экспрессии гена Ctla4.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Кулебякина М.А.<sup>1</sup>, Семина Е.В.<sup>2</sup>, Рубина К.А.<sup>1</sup>, Ткачук В.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России  
surina.mary@gmail.com

**ВЫЯВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ Т-КАДГЕРИНА И УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В ЭМБРИОНАЛЬНОМ МОЗГЕ МЫШИ**

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является исследование механизмов роста и регенерации нервной ткани. В последние годы особый интерес при этом стали представлять молекулы, способные влиять на траекторию роста нервов при развитии и регенерации нервной ткани. Перспективными представителями таких навигационных молекул являются GPI-заякоренные белки Т-кадгерин (Tcad) и урокиназный рецептор (uPAR). Полиморфизмы генов этих белков у человека коррелируют с выраженными неврологическими нарушениями и когнитивными дисфункциями (Lasky-Suetal 2008, PMID:18821565; Archintietal 2011, PMID:20874700), что позволяет предполагать вовлеченность Tcad и uPAR в формирование и созревание структур мозга. В нашей лаборатории были получены данные о том, что урокиназный рецептор способен регулировать направление роста и ветвление аксонов (Seminaetal 2016, PMID: 27324124). Также имеются сведения о том, что Т-кадгерин влияет на направление роста аксонов в развивающемся мозге (Hayanoetal 2014, PMID: 25468941). Тем не менее, роль Tcad и uPAR в морфогенезе мозга остается до конца не выясненной. Целью настоящей работы было оценить экспрессию Tcad и uPAR в эмбриональном головном мозге мыши. Для этого на криосрезках мозга мышей линии NMRI, выделенных на 14 (E14) и 18 (E18) день эмбрионального развития, проводили хромогенную in situ гибридизацию с использованием зондов, специфичных к 5' и 3'- концевым участкам мРНК исследуемых генов. Экспрессию на уровне белка на этих же стадиях эмбрионального развития оценивали методом иммуногистохимического окрашивания с использованием антител, специфичных к Tcad и к uPAR. По результатам in situ гибридизации удалось выявить экспрессию Tcad на стадии E14 в следующих структурах: грушевидная кора, кортикальная пластинка, ганглий тройничного нерва, а также формирующийся глазной бокал; на 18 день: слуховая и зрительная кора, гиппокамп, скорлупа хвостатого ядра, таламус. Часть наших результатов согласуется с данными других авторов (Killenetal 2017, PMID:28386779). Согласно результатам иммуногистохимического окрашивания, экспрессия белка Tcad на стадии E14 наблюдается в глазодвигательном, зрительном и верхнечелюстном нервах, пигментном эпителии сетчатки и латеральном ганглионарном бугорке; на стадии E18 — в зрительной коре, задней комиссуре, гиппокампе. Экспрессию uPAR методом иммуногистохимии удалось обнаружить также на ранней стадии E14 в латеральном ганглионарном бугорке, в зрительном органе, а также в глазодвигательном, зрительном и верхнечелюстном нервах; на более поздней стадии E18 — в структурах среднего мозга и гиппокампа. Таким образом, на основании проведенного исследо-

вания, обнаруженная экспрессия Tcad и uPAR позволяет предполагать участие этих белков в формировании и созревании структур головного мозга, в том числе, ответственных за формирование когнитивных функций.

Финансирование исследования: Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Куликова Г.В., Низяева Н.В., Наговицына М.Н., Щеголев А.И.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова»  
gvculikova@gmail.com

**ЭКСПРЕССИЯ TLR4 И ИНГИБИТОРА TOLLIP В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Важная роль плаценты в защите плода от внутриутробной инфекции обеспечивается рецепторами врождённого иммунитета — toll-likereceptors (TLR), обладающими способностью узнавать консервативные молекулярные структуры (паттерны), специфичные для больших групп патогенов. Комплексная оценка экспрессии TLR4 и его ингибитора Tollip в плаценте позволит определить их значение в генезе такого осложнения беременности, как преэклампсия (ПЭ).

**ЦЕЛЬ.** Изучить экспрессию TLR4 и его ингибитора Tollip в образцах плацент, полученных от женщин, страдающих ранней (РПЭ) или поздней преэклампсией (ППЭ).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Образцы плацент от 5 пациенток с клиническими проявлениями РПЭ (до 34 нед. гестации) и от 5 беременных с признаками ППЭ (после 34 нед. гестации); группы сравнения: 4 пациентки — с преждевременными оперативными родами на 30–32 нед. гестации (ранняя норма — РН) и 4 — с физиологическим течением беременности доношенного срока (поздняя норма — ПН). Иммуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых срезах, толщиной 4 мкм, с применением первичных моноклональных антител к TLR4 (1:200; Abcam; USA) и к Tollip (1:200; Termoscientific), экспрессия оценена с использованием программного обеспечения (NIS-ElementsAR) для микроскопа NikonEclipse. Статистическая обработка количественных данных проведена в пакете программ «Statistica 8.0». Различия оценивались как статистически значимые при  $p < 0,05$ . Согласно результатам качественного анализа иммуногистохимических препаратов во всех группах исследования установлена экспрессия TLR4 и Tollip в синцитиотрофобласте (СЦТ) и эндотелии сосудов (ЭНД) хориальных ворсин, в гладкомышечных клетках стенок сосудов, в синцитиальных почках, децидуальных клетках, клетках инвазивного трофобласта и амниотического эпителия. Количественная оценка экспрессии TLR4 в образцах свидетельствует о повышенном уровне экспрессии в группе РПЭ по сравнению с РН (СЦТ:  $0,21 + 0,023$  и  $0,13 + 0,018$ ,  $p < 0,01$ ; ЭНД:  $0,11 + 0,013$  и  $0,06 + 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). В плацентах при ППЭ интенсивность окрашивания TLR4 была сопоставима со значениями в группе ПН (в СЦТ- $0,185 + 0,017$



и  $0,180 \pm 0,026$ ; в ЭНД —  $0,082 \pm 0,008$  и  $0,076 \pm 0,0140$ ,  $p > 0,05$ ). Сравнение уровней экспрессии Tollip в плацентах исследованных групп не выявило значимых различий ( $p > 0,05$ ).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, установленное при ранней преэклампсии повышение экспрессии TLR4 в эндотелии сосудов и синцитиотрофобласте ворсин плаценты, а также отсутствие изменений уровня Tollip в этих же структурах, может рассматриваться как избыточная активация TLRs, приводящая к регуляторному дисбалансу, дисфункции синцитиотрофобласта и эндотелия сосудов хориальных ворсин. Учитывая, что Toll-like-сигнальный каскад также связан с пролиферативной активностью клеток, изменение активности этих сигнальных путей может приводить к снижению регенерации и роста ворсинчатого дерева.

Финансирование исследования: *Бюджет.*

**Харитонов А.Е.<sup>1</sup>, Лебедева О.С.<sup>1</sup>,  
Черноусова В.А.<sup>2</sup>, Сурдина В.А.<sup>1</sup>,  
Клинов Д.В.<sup>1</sup>, Лактионов П.П.<sup>2</sup>,  
Лагарькова М.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины  
ФМБА России

<sup>2</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН  
maryalag@yahoo.com

#### **ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА**

Дегенерация макулы — заболевание, широко распространенное во всем мире. Десятки миллионов людей страдают от возрастной макулодегенерации, есть и наследственные формы. Поиск надежных источников для трансплантации компонентов сетчатки, (в частности, пигментного эпителия) является чрезвычайно важной проблемой. Плюрипотентные стволовые клетки человека (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, иПСК) способны самообновляться и дифференцироваться во все типы соматических клеток. Это делает их ценным источником дифференцированных клеток для заместительной терапии. Клинические испытания пигментного эпителия сетчатки (RPE), дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток, начаты в Соединенных Штатах и Японии. Пионерские клинические испытания выявили необходимость оптимизации методов дифференцировки RPE для стандартизации материала для будущей клеточной терапии. Для эффективного лечения RPE должен повторить физиологию естественного RPE человека. Более того, возможно, что доставка клеток в виде суспензии не является оптимальной для будущей терапии, и необходима разработка соответствующих подложек для доставки клеток к месту повреждения. Мембрана Бруха — важная структура глаза, которая обеспечивает поддержку для создания неповрежденного и функционального слоя RPE. Мы разработали надежный протокол дифференцировки и экспансии RPE из неинтегрированных иПСК от здоровых доноров. Полученные клетки RPE экспрессируют маркеры пигментного эпителия, имеют соответствующий трансэпителиальный потенциал и способность к фагоцитозу. Для получения высокополяризованного зрелого RPE мы подготовили методом электроспиннинга набор по-

ристых нановолоконных подложек из различных материалов, чтобы имитировать мембрану Бруха. Мы протестировали способность мембран поддерживать созревание и поляризацию пигментного эпителия сетчатки, дифференцированного из иПСК. Клетки RPE, культивируемые на модифицированном полиуретане, показали хорошую адгезию, гексагональную морфологию клеток, плотные контакты, способность к накоплению пигмента и фагоцитозу.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ 14-15-00930.*

**Лагутина А.А.<sup>1,2</sup>, Рыбченко В.В.<sup>1,2</sup>,  
Будкевич Л.И.<sup>1,2</sup>, Александров А.В.<sup>1,2</sup>,  
Старостин О.И.<sup>1,2</sup>, Шурина Л.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> НИИ хирургии детского возраста ФГБОУ ВО  
«Российский национальный исследовательский  
медицинский университет им. Н.И. Пирогова»  
Минздрава России

<sup>2</sup> ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского»  
ДЗ г. Москвы

#### **ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ЧРЕСКОЖНОЙ РИГОТТОМИИ И ЛИПОФИЛИНГА ПРИ ЛЕЧЕНИИ РУБЦОВЫХ ДЕФОРМАЦИЙ У ДЕТЕЙ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Хирурга не всегда устраивает результат реконструктивно-пластических операций у больных с патологическими рубцами и деформациями мягких тканей. На настоящий момент ведутся поиски новых альтернативных и малоинвазивных методов хирургической коррекции. Риготтомия и липофилинг — метод хирургической коррекции рубцовых деформаций и рубцов. Суть методики состоит из 3-х принципиальных моментов. Риготтомия увеличивает площадь реконструируемого сегмента, что в дальнейшем при выполнении липофилинга позволяет восстановить контуры и объем. А также, отмечается качественное изменение характеристики мягких тканей в области проведения операции — увеличение площади, мягкости, податливости, уменьшение толщины, улучшение гладкости и внешнего вида кожи, вероятно, за счет жизнедеятельности прижившихся адипоцитов и действия других вводимых биологически активных компонентов липоаспирата.

**ЦЕЛЬ.** Оценка преимуществ данного метода в сравнении с классическими хирургическими операциями.

**ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Оценены результаты лечения 25 детей с посттравматическими деформациями и послеожоговыми рубцами и деформациями различной локализации, госпитализированных в ДГКБ № 9 им. Г.Н.Сперанского с 1.09.2016 по 20.07.2017. Этапы проведения хирургической коррекции: I этап — собственно липосакция (тумесцентная). II этап (основной) — подготовка донорского ложа для пересадки жировых клеток. Выполнение риготтомии (формирование подкожных каналов с помощью пересечения рубцово-измененных тканей в разной плоскости), которые впоследствии заполняются липоаспирацией. III этап — подкожное и/или внутрикожное введение липографтов для восполнения объема при контурных деформациях.

Пациенты условно разделены на группы: первая группа — 10 детей с контурными деформациями (послеожоговыми и посттравматическими). Лечение проведено в несколько этапов (не менее 3). Первый этап позволяет восполнить не более 20–30% площади дефекта. Для хирургической коррекции

у пациентов данной группы в основном использовался липофилинг.

Вторая группа — 9 детей с гипертрофическими рубцами и контрактурами крупных суставов. Первым этапом выполнена агрессивная ригототомия и с последующим внутрикожным введением липографтов для устранения контрактур.

Третья группа — 6 детей с послеожоговыми рубцами, нарушениями структурного состава кожи. Всем пациентам потребовалось выполнение 1–2 этапов липофилинга в сочетании с ригототомией, что позволило улучшить качественный состав кожи и частично устранить косметический дефект.

У всех пациентов получен хороший косметический и функциональный результат. Осложнений не получено.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Преимуществами данной методики являются:

- сокращение сроков госпитализации больного;
- устранение косметического дефекта и деформаций;
- формирование и восстановление подкожно — жирового слоя;
- улучшение эластичности кожного покрова;
- улучшение качества психо-социальной адаптации детей с дефектами мягких тканей.

**Латыева О.О.<sup>1</sup>, Киселева Е.В.<sup>2</sup>,  
Васецкий Е.С.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Биологический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>3</sup> UMR 8126, CNRS, Institut de Cancérologie  
Gustave-Roussy, Villejuif, France  
olatyeva94@gmail.com

### **ИММОТАЛИЗОВАННЫЕ МИОБЛАСТЫ — КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ ЛИЦЕ-ЛОПАТОЧНО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (ЛЛПМД или мышечная дистрофия Ландузи — Дежерина) — прогрессирующее аутосомно-доминантное заболевание с частотой встречаемости в Европе 1:8000. Наиболее распространенная форма ЛЛПМД (FSHD1) является результатом комбинации трех мутаций на хромосоме 4q35: сокращения количества повторов D4Z4 массива и двух полиморфизмов (4qA161 и 4qA). Такая комбинация приводит к увеличению экспрессии генов DUX4, DUX4c, FRG1, FRG2, ANT1 и др. В процессе развития ЛЛПМД происходит замещение мышечной ткани соединительной и жировой, что, возможно, является следствием нарушения механизма регенерации мышечной ткани. Известно, что миобласты, выделенные от больных доноров, имеют морфологические дефекты при дифференцировке *in vitro*: образуют тонкие атрофические миотубулы с линейным распределением ядер или большие миотубулы со случайным распределением ядер, что может быть причиной ослабления мышц у людей с ЛЛПМД. Миобласты имеют ограниченный пролиферативный потенциал, что затрудняет их использование в исследованиях *in vitro*. Развитие технологий иммортализации позволяет получать бесконечный стандартизованный ре-

сурс клеток для исследований различных патологий. Получение иммортализованных клеточных линий миобластов с фенотипом ЛЛПМД и их характеристика является актуальной задачей регенеративной биомедицины.

**ЦЕЛЬ.** Охарактеризовать иммортализованные миобласты (ИМ) от больных ЛЛПМД и здоровых доноров и исследовать их влияние на миграцию МСК жировой ткани.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В работе использовали 4 культуры ИМ: 2 от здоровых (контроль) и 2 от больных ЛЛПМД доноров. Миобласты были иммортализованы в Институте миологии (Париж) по методу, описанному ранее (ZhuCH, 2007). В качестве контроля использовали культуры первичных миобластов (ПМ) от больных и здоровых доноров, а также ПМ от здорового донора, трансфицированные DUX4. Дифференцировку миобластов проводили по стандартному протоколу, далее оценивали индекс слияния и размер миотубул. Миграцию МСК исследовали в системе Transwell и с использованием клеточного анализатора xCELLigenceDP. Для изучения механизма миграции МСК использовали иммуноцитохимический метод, ПЦР в реальном времени и нейтрализующие антитела к SDF1 $\alpha$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Время удвоения клеточной популяции ИМ и ПМ от здоровых и больных доноров значимо не отличалось. При дифференцировке ИМ, как и ПМ от больных доноров образуют дистрофичные или гипертрофированные миотубулы. Ранее мы показали, что сверхэкспрессия DUX4 в миобластах стимулирует миграцию МСК (Dmitriev et al., 2016). В этой работе продемонстрировано, что ИМ от доноров с ЛЛПМД также способны стимулировать миграцию МСК за счет секреции SDF1.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные результаты указывают на то, что ИМ от больных ЛЛПМД и здоровых доноров могут быть использованы для исследований клеточных взаимодействий, процессов дифференцировки и регуляторных путей, участвующих в этих процессах, для расширения понимания механизмов развития ЛЛПМД и разработки новых мишеней для терапии.

Финансирование исследования: *Работа проводится в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН 0108-2016-0005.*

**Лебедева А.И.<sup>1</sup>, Муслимов С.А.<sup>1</sup>,  
Афанасьев С.А.<sup>2</sup>, Попов С.В.<sup>2</sup>,  
Кондратьева Д.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Всероссийский центр глазной  
и пластической хирургии» Минздрава России

<sup>2</sup> НИМЦ «НИИ кардиологии» Минздрава России  
jeol02@mail.ru

### **РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИОКАРДА, ИНДУЦИРОВАННЫЙ АЛЛОГЕННЫМ БИОМАТЕРИАЛОМ**

Современные технологии восстановления поврежденного миокарда после инфаркта недостаточно эффективны и не отвечают требованиям полноценной реабилитации больных. Аллогенный биоматериал является стимулятором регенерации тканей и применяется в различных областях медицины: в хирургии, травматологии, офтальмологии, и т.д.

**ЦЕЛЬ.** Исследование стимуляции регенерации ишемически поврежденного миокарда с помощью биоматериала Аллоплант в эксперименте.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальные исследования были проведены на 100 крысах породы Вистар обоего пола массой 0,18–0,25 кг. Всем животным было проведено лигирование коронарной артерии. В I опытной группе одновременно со стенозированием сосуда интрамиокардиально вводили суспензию аллогенного биоматериала в количестве 12 мг, а во II опытной группе 24 мг. В работе использовали гистологические, электронномикроскопические, морфометрические и статистические методы. Индекс площади рубца (ИПР) сердец крыс измеряли на препаратах, окрашенных по Маллори следующим образом: каждое сердце нарезали поперек на 5 секторов, на поперечных срезах отношение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%. Забор сердец для исследования проводили через 3, 7, 14, 30, 45, 90 сут.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** ИПР в контрольной группе составлял 26,65%, в I опытной группе – 9,72% ( $p < 0,05$ ), во II опытной группе – 1,1% ( $p < < 0,0001$ ). Во все сроки эксперимента в реактивной зоне миокарда в контрольной группе степень васкуляризации была меньше, чем в опытной. Суммарная площадь просвета капилляров в I опытной группе составляла  $632,3 \pm 106,6$  мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,5$ ), а в контрольной  $146 \pm 97$  мкм<sup>2</sup>, ( $p < 0,003$ ). Количество макрофагов CD68+ в контрольной группе статистически значимо превышало значения данных клеток в опытной группе в реактивной зоне миокарда в период наблюдения 3–14 сут.к ( $p < 0,003$ ). В I опытной группе численность c-kit+ клеток превышала количество клеток в контрольной группе, особенно в начальные сроки эксперимента. Количество исследуемых клеток через 3 сут. превосходило значения контрольной группы в 6,25 раз, что связано с их миграцией к частицам биоматериала. При определении свободных стволовых c-kit+ клеток, которые не подвергались фагоцитозу макрофагами, выявлено, что их численность в опытной группе также превосходила контрольную группу ( $p < 0,0001$ ) во всем периоде наблюдений. Клетки GATA-4 обнаруживались в реактивной зоне ишемически поврежденного миокарда и превосходили количество клеток в контрольной группе на всем протяжении эксперимента в 3 раза. Численность MMP9+ клеток в контрольной группе была выше, чем в опытной ( $p < 0,001$ ), что обуславливало высокий уровень ИПР. Количество Timr 2+ клеток в I опытной группе было выше, чем в контрольной ( $p < 0,001$ ). Электронномикроскопически зафиксированы кардиомиогенные клетки в различной степени дифференциации от кардиобластов до юных кардиомиоцитов. Также, была выражена реакция муральных клеток и клеток Аничкова в регенерате.

Полученные данные позволяют сделать выводы о положительном влиянии на миокард БМА за счет снижения площади рубца, усиления васкулогенеза, индукции стволовых и прогениторных клеток, кардиопротективного эффекта.

Финансирование исследования: *Гос. задание НИОКР 115040870057 от 8.04.2015.*

**Лежава С.П.<sup>1</sup>, Кудрявцева В.Л.<sup>2</sup>,  
Захарова А.А.<sup>3</sup>, Першина А.Г.<sup>1,3</sup>,  
Аточина-Вассерман Е.Н.<sup>4,5</sup>**

<sup>1</sup> Центральная научно-исследовательская лаборатория, Сибирский государственный медицинский университет

<sup>2</sup> Лаборатория изучения механизмов нейропротекции центра RASA в Томске, Национальный исследовательский Томский политехнический университет

<sup>3</sup> Институт физики высоких технологий, Национальный исследовательский Томский политехнический университет

<sup>4</sup> Лаборатория изучения механизмов сигнальной трансдукции центра RASA в Томске, Национальный исследовательский Томский политехнический университет

<sup>5</sup> Отделение пульмонологии и интенсивной терапии, Университет Пенсильвании, США  
lezhavasofiya@gmail.com

### **СИСТЕМЫ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ**

Ишемия головного мозга на сегодняшний день является одной из основных причин инвалидизации и смертности, вызывая тяжелые цереброваскулярные последствия и ухудшение качества жизни. Использование аутологичных клеток крови (Muroski, Morshedet al., 2016) (Wang, Shresthaet al., 2012), учитывая их способность переноситься током крови и проникать в ткани, крайне перспективно для доставки лекарств. Для «упаковки» лекарственного средства в клетку могут быть использованы полиэлектролитные микрокапсулы в качестве контейнеров (Timin, Gaoet al., 2017). Огромным преимуществом капсул является их способность «открываться» под действием внешних (Timin, Muslimov et al., 2017) или внутренних факторов (TianandBae, 2012), обеспечивая локальное, контролируемое высвобождение лекарственного препарата. В данной работе нами исследована цитотоксичность полиэлектролитных (полиаллиламин/полистеренсульфонат) капсул диаметром 2 мкм и эффективность их поглощения нейтрофилами периферической крови. Капсулы были получены путем послойного осаждения полиаллиламина и полистеренсульфоната на частицы кальция карбоната и последующим удалением кальций карбонатного ядра раствором ЭДТА (Sukhorukov, Antipovet al., 2001). Исследование проводили на нейтрофилах периферической крови крыс, выделенных с использованием биградиентной системы фиколла с плотностями 1,077 г/мл и 1,093 г/мл. Для определения эффективности захвата нейтрофилы инкубировали с FITC-мечеными капсулами в соотношении 1:5 в течение 24 ч. и анализировали суспензию методом проточной цитометрии (BDAccuriC6). Захват нейтрофилами капсул был подтвержден методом конфокальной микроскопии (ZEISSLSM 780 NLO). Влияние капсул на жизнеспособность клеток определяли микроскопическим методом с использованием трипанового синего. Количество клеток с признаками апоптоза и некроза определяли с использованием набора «AnnexinV-FITC/7AAD» («Beckman Coulter», США) методом проточной цитометрии. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали относительно контроля (без добавления капсул). Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием

пакета программ SPSS Statistics. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . Установлено, что исследуемые полиэлектролитные капсулы не оказывают цитотоксического эффекта на нейтрофилы периферической крови крысы. Жизнеспособность клеток после инкубации в течение 2 ч. согласно данным микроскопии составила не менее 80%. Процент нейтрофилов с цитофлуориметрическими признаками апоптоза и некроза в образцах с добавлением капсул не превышал значений в контрольных образцах. Согласно данным проточной цитофлуориметрии эффективность захвата капсул нейтрофилами составила  $22,6 \pm 1,6\%$ . Таким образом, исследованные полимерные капсулы захватываются нейтрофилами периферической крови и не оказывают негативного влияния на их жизнеспособность. Полученные системы на основе нейтрофилов и полиэлектролитных капсул могут быть использованы для доставки лекарственных препаратов в зону ишемии головного мозга.

**Лисина О.Ю.<sup>1,2</sup>, Московцев А.А.<sup>1</sup>,  
Сури́н А.М.<sup>1,3,4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии  
и патофизиологии»

<sup>2</sup> Московский технологический университет  
(МИРЭА)

<sup>3</sup> ФГАУ «Национальный научно-практический  
центр здоровья детей»

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский  
медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
anezi@yandex.ru

#### **ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МОРФОЛОГИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ В МЕХАНИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ**

Черепно-мозговые травмы, хирургические операции на мозге неизбежно сопряжены с механическим повреждением ткани. Первичные клеточные культуры служат незаменимой моделью для исследования процессов, протекающих в мозге в условиях, имитирующих как норму, так и патологию. В данной работе исследованы изменения морфологии первичной культуры нейронов из мозжечка 7-дневных крыс в течение 2,5 нед. от момента посадки клеток, а также после механического повреждения культуры. Процесс регистрировали с помощью системы прижизненной визуализации и анализа IncuCyteZOOM с интервалом 20 мин., записывая изображения индивидуальных нейронов в проходящем свете, а также флуоресцентные изображения митохондрий в телах нейронов. Образование митохондрий и развитие в них электрического трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) отслеживали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда TMRM, который непрерывно присутствовал в культуре с момента посадки. Обнаружено, что морфологические изменения развивающейся первичной культуры нейронов (суммарная длина нейритов, их способность объединяться в пучки, относительная площадь сомы) характеризуются тремя фазами, отличающимися по кинетике и продолжительности. Митохондриальный зонд TMRM (20 нМ) не влиял на количество фаз, но заметно менял их продолжительность и амплитуду. С целью моделирования механической травмы мозга монослой первичной нейрональной культуры царапали пластиковым наконечником спустя 23 ч.

после посадки нейронов. Обнаружено, что аксоны из неповрежденной области прорастают в зону царапины по маршрутам преимущественно в направлении нейронов, сохранившихся в царапине. Полученные результаты демонстрируют, что непрерывный мультипараметрический оптический мониторинг может дать уникальную информацию о динамике развития нейрональной культуры, в том числе, при исследовании процессов регенерации нервной сети, подвергнутой механическому повреждению.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантами РФФИ 16-04-00792, РФФИ 15-04-01869 и РНФ 17-15-01487.*

**Литвинов В.В.<sup>1</sup>, Лемкина Л.М.<sup>2</sup>, Фрейд Г.Г.<sup>1</sup>,  
Коробов В.П.<sup>2</sup>, Кузнецова В.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Пермский государственный медицинский  
университет

<sup>2</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения РАН  
Drlitvinov@mail.ru

#### **МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В МЯГКИХ ТКАНЯХ У МЫШЕЙ ВОКРУГ ОТРЕЗКА ТЕФЛОНОВОГО КАТЕТЕРА С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА**

Известно, что антибактериальные пептиды помимо активации литического разрушения бактерий, обладают непосредственным влиянием на защитные механизмы организма хозяина и регенерацию, способствуя миграции и дифференцировке различных клеточных элементов. Исследования проводились на 15 белых мышах, разделенных на контрольную и опытную группы. Животным обеих групп под эфирным наркозом под кожу спины имплантировали фрагмент стерильного тefлонового катетера длиной 0.5 см. Опытной группе — отрезки катетеров, предварительно обработанные антибактериальным пептидом варнерином, контрольной группе — без обработки пептидом. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфира в 1, 2 и 3 сут. эксперимента, после чего проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование тканей вокруг отрезков катетеров по общепринятым методикам. Подкожное введение обработанных варнерином отрезков катетеров по сравнению с группой контроля, приводит к достоверному увеличению в окружающих импланты тканях количества нейтрофилов и снижению количества фибробластов. На 3 сут. в этих зонах отмечалось также наличие Т- и В-лимфоцитов (CD3+, CD20+) с отсутствием положительной реакции на виментин и CD34. Ограничительный вал, представленный грануляционной и соединительной тканью вокруг отрезков катетеров, в опытной группе имел неравномерную толщину и большое количество складок. Увеличение нейтрофилов и появление лимфоцитов в клеточном инфильтрате может быть объяснено способностью привлечения антибактериальными пептидами тучных клеток, которые повышают проницаемость микроциркуляторного русла для различных гуморальных и клеточных факторов иммунного ответа. Имеются данные о том, что и сами антибактериальные пептиды являются сильными хемотаксантами для лимфоцитов. Большое количество фибробластов и высокая экспрессия виментина свидетельствует об активности процессов репарации, которые происходит

с участием провоспалительных цитокинов. При этом показана способность ряда антибактериальных пептидов ингибировать синтез провоспалительных цитокинов. Рецепторы CD34 эндотелиальных клеток сосудов являются одним из видов молекул клеточной адгезии, а также являются маркером прогениторных клеток, участвующих в репарации. Высокая экспрессия CD34 свидетельствует об активации как воспалительных, так и репаративных процессов. Есть основания полагать, что показанное нами отсутствие в тканях, CD34 и виментина непосредственно связано с действием варнерина как антибактериального пептида. На основании изучения вышеуказанных изменений применение варнерина в трехсуточный срок ведет к снижению уровня клеточной регенерации, но при этом скорее всего имеет положительное значение за счет уменьшения выраженности фиброза.

**Литвяков Н.В.<sup>1,2</sup>, Ибрагимова М.К.<sup>1,2</sup>,  
Цыганов М.М.<sup>1</sup>, Дорошенко А.В.<sup>1</sup>,  
Небова Ю.А.<sup>2</sup>, Вернадский Р.Ю.<sup>1</sup>,  
Слонимская Е.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет  
nvlitv72@yandex.ru

#### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

Ранее при исследовании клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) было выявлено, что появление в процессе НАХТ или сохранение в резидуальной опухоли после химиотерапии клонов, несущих амплификации в 2-х и более регионах: 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q, сопряжено со 100% гематогенным метастазированием [Ибрагимова М.К. и др., Биохимия, 2017]. На основании этих данных нами была высказана рабочая гипотеза о том, что клоны, несущие амплификации в 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p локусах являются потенциальными метастатическими клонами. Их появление в опухоли в процессе канцерогенеза или под действием химиотерапии является одним из последних этапов опухолевой эволюции и может происходить даже при малых размерах (T1-T2) опухоли. Аннотирование генного состава амплифицированных регионов (5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p) показало, что в каждом из них находятся гены, которые связывают с индукцией стволовых клеток, в частности: OCT3 – 6p21.31, KLF4 – 9q31, MYC – 8q24, которые составляют коктейль Яманаки, и многие другие (5p15.33 TERT; 7q32.1 SMO; 8q11.21 SNAI2; 9p21.2 MOB3B; 9q22.33 TGFB1; 10p11.23 BMI1; 10p13 VIM; 13q12.2 FLT3; 16p11.2 LAT; 18q21.1 SMAD2; 19p13.3 LMNB2; 19p13.13 KLF1 и 19q13.2 TGF-β1). Мы полагаем, что в процессе клональной эволюции опухоли соматическими (не стволовыми) опухолевыми клетками, благодаря гиперэкспрессии (например, за счет амплификации локусов) этих генов, приобретает способность к обратному переходу (транзиции) в опухолевые стволовые клетки (мы назвали его сомато-стволовой переход). Предполагается, что только такие опухолевые клетки могут образовывать метастазы. В настоящей рабо-

те изучалась экспрессия генов сомато-стволового перехода, локализованных в 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q, в опухоли молочной железы при проведении НАХТ. Анализ производился на основе материала 62 больных раком молочной железы (РМЖ) стадией IIA – IIIB до (биопсия) и после проведения НАХТ (операционный материал). У 14 больных в течение 5 лет после лечения развились гематогенные метастазы. В результате исследования показано, что до проведения лечения количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода в опухоли у больных без метастазов и с метастазами не различается и составляет 6/16 (38%) и 7/16 (44%), соответственно. После проведения НАХТ в остаточной резидуальной опухоли у больных без метастазов количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода остается прежним, в то время как у больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НАХТ количество гиперэкспрессированных генов увеличивается в два раза и составляет 14/16 (88%). Это подтверждает нашу гипотезу о важной роли активации способности к сомато-стволовому переходу для метастазирования опухолей, причем в данном случае активация происходит под действием неоадъювантной химиотерапии.

Финансирование исследования: Работа поддержана грантом РФФ 17-15-01203.

**Ревина Н.В., Дияськина Е.В., Костин С.В.**

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва  
liyaskina@yandex.ru

#### **РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ**

Бактериальная целлюлоза (БЦ) имеет большие перспективы использования в качестве медицинского материала [1–3]. В отличие от синтетических полимеров, она является биологически совместимой, не токсична, не вызывает аллергии и физического отторжения. Гель-пленка БЦ (ГПБЦ) поддерживает оптимальный баланс влажности, стимулирующий заживление; отлично пропускает жидкости и газы; активно насыщается лекарственными препаратами и свободно отдает их в поврежденную зону; поглощает продукты распада тканей; служит почти непреодолимым физическим барьером для инфекции. Плоская ГПБЦ – это идеальная повязка при пересадке кожи, лечении ран, послеоперационных швов и язв. Активная роль БЦ заключается в стимулировании регенерационных процессов. Она помогает восстановлению базальной мембраны, ускоряет эпителизацию и зарубцовывание. При этом становится возможным осуществить тканевую инженерию – чужеродный материал служит каркасом, который заполняется дифференцированными клетками и межклеточным веществом. Целью работы было изучение возможности применения пленочных покрытий из бактериальной целлюлозы для лечения раневых инфекций и разрывов печени. Объектом исследования являлась очищенная ГПБЦ, полученная при статическом культивировании бактерии *Glucanacetobacter sucrofermentans* В-11267 на среде HS [4-6]. В результате исследований получены новые антисептические материалы, которые можно рекомендовать в качестве раневых покрытий.

Изучены их антибактериальные, физико-химические и физико-механические свойства. Проведенные исследования подтверждают возможность использования пленочного покрытия из бактериальной целлюлозы с использованием адсорбированных лекарственных препаратов для лечения раневых инфекций и разрывов печени.

#### Литература:

1. Rajwade J.M., Paknikar K.M., Kumbhar J.V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 99, N 6. P. 2491-2511.

2. Ullah H, Wahid F, Santos HA, Khan T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. Carbohydr Polym. 2016. Vol.150. P. 330-352.

3. Fu L., Zhang J., Yang G. et al. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair // Carbohydrate Polymers. 2013. Vol. 92, N 2. P. 1432 – 1442.

4. Ревин В. В., Лияськина Е. В. Штамм *Glucanacetobacters ucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы. Патент РФ № 2523606. 12.03.2013.

5. Ревин В. В., Лияськина Е. В., Назаркина М. И. Способ получения бактериальной целлюлозы. Патент РФ № 2536973. 6.12.2013.

6. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E., Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing // Journal of Physics: Conference Series. 2017. Vol. 784, N 1. P. 012034.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» (код 0025918).*

**Лобанова М. В., Ратушный А. Ю.,  
Буравкова Л. Б.**

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН  
rogodina\_m@mail.ru

#### **ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ HIF-1 $\alpha$ И HIF-3 $\alpha$ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА**

Актуальной задачей при применении средств клеточной терапии в настоящее время является повышение устойчивости мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) к неблагоприятным факторам микроокружения, таким как окислительные стресс, снижение уровня поступления питательных и ростовых веществ. Ранее нами было показано, что культивирование в условиях снижения содержания кислорода способствует поддержанию жизнеспособности ММСК при действии глюкозной депривации. Среди возможных механизмов, обуславливающих данный процесс, может рассматриваться активация HIF-зависимых сигнальных путей, поскольку известно, что данный транскрипционный фактор имеет множество генов-мишеней, продукты которых регулируют энергетический обмен в клетках. В данной работе методом ОТ-ПЦР в реальном времени проводилось изучение уровня экспрессии генов HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в ММСК при критическом снижении концентрации глюкозы в условиях различного содержания кислорода в среде культивирования. Исследовали клетки при постоянном культивировании в условиях 20% и 5% O<sub>2</sub>, а также изменении содержания кислорода с 20% и 5% до 1% на 72 ч. Содержание глюкозы в среде культивирова-

ния уменьшали до 10% от контроля также на 72 ч. В ходе работы было показано, что при длительном культивировании ММСК в условиях 5% содержания кислорода достоверного изменения экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  не происходит, в то время как при 1% O<sub>2</sub> количество мРНК HIF-1 $\alpha$  уменьшается в 2 раза по отношению к клеткам в 20% O<sub>2</sub>, а экспрессия HIF-3 $\alpha$  увеличивается более чем в 3 раза по сравнению с той же группой клеток. При действии глюкозной депривации (72 ч.) достоверное увеличение экспрессии HIF-1 $\alpha$  было обнаружено только в клетках, постоянно культивируемых в 1% кислорода. По сравнению с контролем при том же содержании кислорода данный показатель изменился более чем в 5 раз. При 20% и 5% кислорода наблюдалась только тенденция к повышению количества мРНК данного гена. Достоверных различий в экспрессии HIF-3 $\alpha$  во всех группах клеток не наблюдалось. В условиях глюкозной депривации при одновременном снижении содержания кислорода до 1% в ММСК, ранее культивируемых при 20% кислорода, более чем в 3 раза увеличивалась экспрессия гена HIF-1 $\alpha$ . В клетках из 5% кислорода наблюдалась тенденция к увеличению количества мРНК HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , однако достоверных различий не было. Таким образом, продукт гена HIF-3 $\alpha$ , вероятно, не принимает участия в ответе ММСК на низкое содержание глюкозы в среде культивирования. Можно предположить, что за адаптацию клеток к данному параметру отвечает HIF-1 $\alpha$ , экспрессия которого активируется при определенном низком значении содержания кислорода.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 16-34-01336 мол\_а.*

**Лузгина Н. Г.<sup>1</sup>, Русанов А. Л.<sup>2</sup>, Бурунова В. В.<sup>1</sup>,  
Наход К. В.<sup>1</sup>, Канашенко С. Л.<sup>1</sup>, Лисица А. В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биомедицинской химии  
им. В. Н. Ореховича

<sup>2</sup> ООО НПО «Перспектива»  
g-s2011@gmail.com

#### **ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БЕЗОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ**

Отдельные виды продукции (химические вещества, лекарственные препараты, косметические средства и биомедицинские клеточные продукты) обоснованно считаются потенциально опасными для здоровья человека.оборот таких продуктов может быть разрешен только после предварительных лабораторных испытаний, устанавливающих степень их опасности для здоровья человека. Основным объектом испытаний являются лабораторные животные. Ежегодно в мире от 100 до 130 млн лабораторных животных погибает при проведении таких исследований. Однако, с развитием тканевой инженерии, стало возможным использование других объектов исследования – клеточных моделей органов и тканей человека. Цель работы: оценить возможность использования стандартизированной клеточной модели эпидермиса человека (КМЭЧ) для установления в тестах in vitro способности химической продукции вызывать повреждение кожи. Используется химическое вещество – додецилсульфат натрия (ДСН), раздражающее действие которого на кожу человека хорошо известно. Сравнивали информативность

двух методических подходов: *in vivo* (классический) и *in vitro* (альтернативный). Оценку повреждающего действия ДСН на кожу лабораторных животных проводили в соответствии с ГОСТ 32436-2013 на беспородных кроликах. Покраснение кожи наблюдали уже через 3 мин. после начала воздействия ДСН, максимальный раздражающий эффект (выраженная эритема и отек кожи) отмечался через 24 ч. после нанесения ДСН. Таким образом, исследование *in vivo* подтвердило наличие у ДСН способности повреждать кожу. Исследования *in vitro* проводили в соответствии с рекомендациями Организации экономического сотрудничества и развития и ГОСТ 32634-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Разъедание/коррозия кожи: испытание на модели человеческой кожи *in vitro*». Объектом исследования была стандартизованная КМЭЧ, которую получали на основе нормальных кератиноцитов человека, культивируемых на границе фаз жидкость/воздух в течение 14 дней по специализированному протоколу. При гистологическом исследовании в структуре эпидермиса наблюдали не менее 5 слоев ядродержащих клеток и вышерасположенный роговой слой. По данным сканирующей электронной микроскопии, роговой слой содержит от 10 до 15 слоев роговых чешуек. Валидацию КМЭЧ проводили с использованием контрольного вещества – 1% раствора тритона X-100, в отношении которого определяли величину показателя ET50 (составила  $3,8 \pm 0,3$  ч.). ДСН равномерно наносили на поверхность КМЭЧ. Через 3 мин. жизнеспособность клеток модели снизилась незначительно (до  $92 \pm 5\%$  от исходного уровня). Однако воздействие ДСН на КМЭЧ в течение часа привело к существенному снижению жизнеспособности клеток (до  $8 \pm 4\%$  от исходного уровня), что, в соответствии с ГОСТ 32634-2014, позволило подтвердить способность ДСН вызывать повреждение кожи. Таким образом, продемонстрирована перспективность использования тканеинженерной конструкции эпидермиса для исследования безопасности химической продукции в отношении здоровья человека.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0129, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0129).*

**Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>, Чернявский А.М.<sup>1</sup>, Фомичев А.В.<sup>1</sup>, Суровцева М.А.<sup>1,2</sup>, Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>, Ким И.И.<sup>1,2</sup>, Карева Ю.Е.<sup>1</sup>, Таркова А.Р.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
<sup>2</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Институт цитологии и генетики СО РАН  
aplykov2@mail.ru

#### **ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА**

При хронической сердечной недостаточности (ХСН) одним из методов улучшения функции миокарда является непрямая реваскуляризация. Другим направлением в терапии ХСН является использование

аутологичных костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК), которые вводятся либо в коронарные артерии, либо интрамиокардиально с использованием системы NOGA. Эффективность клеточной терапии зависит от жизнеспособности трансплантата. Известно, что эритропоэтин повышает выживаемость клеток при гипоксии. Цель исследования – оценка фенотипа клеточного трансплантата из костного мозга у больных с ХСН. Работа выполнена на 30 больных в возрасте 45-74 лет, с ишемической болезнью сердца с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHAII-III класса, которым выполнена аортокоронарное шунтирование (трансмокардиальная лазерная реваскуляризация) с введением в лазерные каналы простимулированных КМ-МНК. КМ-МНК выделяли на градиенте плотности фиколл/верографин из аспирата костного мозга клетки. Исследовали морфофункциональные свойства КМ-МНК (фенотип, фазы клеточного цикла, апоптоз). до и после воздействия эритропоэтина. Клеточный трансплантат состоял из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК, CD45+/CD34- клетки), эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК, CD34+, CD31+, CD133+, VEGFR-2+ клетки) и мезенхимных стволовых клеток (CD73+, CD90+, CD105+ клетки). Эритропоэтин увеличивал ко-экспрессию рецептора к эритропоэтину на ГСК и количество ЭПК, экспрессирующих «хоуминг» рецептор (CD184), задерживал клетки с фенотипом CD34+ в фазе покоя/начального роста (G0G1). Таким образом, аутологичный костномозговой клеточный трансплантат характеризуется наличием клеток, относящихся к трем основным популяциям стволовых клеток – гемопоэтических, эндотелиальных и мезенхимных, а предобработка его эритропоэтином увеличивает количество хоуминг рецептора и способствует снижению чувствительности клеток к токсическому действию неблагоприятных факторов окружающей среды, что в комплексе может способствовать формированию новых сосудистых систем в перинфарктной зоне ишемизированного миокарда.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (Заявка № 16-15-00057).*

**Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>, Суровцева М.А.<sup>1,2</sup>, Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>, Ким И.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
<sup>2</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Институт цитологии и генетики СО РАН  
aplykov2@mail.ru

#### **ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Использование сосудистых протезов малого диаметра из синтетических материалов для аортокоронарного шунтирования широко применяется в кардиохирургии. Перспективным направлением является использование синтетических сосудистых протезов, заселенных аутологичными стволовыми/прогениторными клетками. Целью исследования стало изучение влияния экстрацеллюлярного матрикса

на свойства эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) *in vitro*. ЭПК выделяли из мобилизованных стволовых/прогениторных клеток введением Г-КСФ от больных ИБС, а МСК из ядросодержащих клеток костного мозга крыс-самцов Wistar. Фенотип ЭПК оценивали до и после процедуры мобилизации Г-КСФ, исследовали на цитофлуориметре FACSCantoll с использованием моноклональных антител, к CD34, CD45, CD133 и KDR. Популяцию ранних и поздних ЭПК получали на подложке из желатина и фибронектина. Фенотип МСК определяли на основании цитодифференцировки клеток в остеогенном и адипогенном направлении. Функциональные свойства ЭПК исследовали по уровню продукции цитокинов, а МСК на основании миграционного потенциала, продукции цитокинов и заселения фрагментов сосудистых протезов из ПТФЭ. Показано, что Г-КСФ мобилизует в периферическое русло как ранние, так и поздние ЭПК. Условия кондиционирования ЭПК *in vitro* влияют на уровень продукции цитокинов. Плотность заселения фрагментов сосудистых протезов из ПТФЭ МСК зависит от типа экстрацеллюлярного матрикса, использованного для предобработки поверхности кондуитов. Таким образом, экстрацеллюлярный матрикс способствует росту ранних и поздних ЭПК, изменению спектра продукции цитокинов, а также плотности прикрепления и заселения к синтетическим материалам.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 17-75-30009).*

**Льонг Т.З.<sup>1</sup>, Сираева З.Ю.<sup>1,2</sup>, Ергешов А.А.<sup>1</sup>, Садыкова Ф.Р.<sup>1</sup>, Абдуллин Т.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

luongthajduong@gmail.com

#### **ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОГЕЛЕВЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ ДИВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ**

Дивалентные металлы, включая металлы переходной группы, играют важную роль в регуляции процессов функционирования, замещения и посттравматической регенерации тканей. Применение соединений металлов в комбинации с тканеинженерными материалами является перспективным подходом в лечении дегенеративных и травматических заболеваний (V. Mouriftoet al. J. R. Soc. Interface. 2012, 9, 401). Нами разработан подход к контролируемому введению бивалентных металлов (кальций, цинк, кобальт, марганец и др.) в химически сшитые гидрогели на основе желатина. Сшивку желатина проводили бифункциональными сшивающими агентами при комнатной температуре и при замораживании, с образованием гидрогелей, имеющих разную пористость и плотность. Получены экспериментальные образцы гидрогелей с различным содержанием дивалентных металлов, которое определяли методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в режиме элементного анализа и рентгено-флуоресцентного анализа. Установлено, что введение металлов в гидрогели повышает индекс набухания гидрогелевого компонента и уменьшает содержание

воды в порах по сравнению с гидрогелями, не содержащими металлы. По данным ротационной реометрии композиционные гидрогели характеризуются повышенными значениями модуля упругости и линейного диапазона вязкоупругости. Результаты свидетельствуют об образовании дополнительных сшивок в композиционных гидрогелях и, как следствие, повышении их стабильности и упругости. По данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и СЭМ композиционные гидрогели обладают однородной ячеистой структурой с более мелким размером пор, чем однокомпонентные гидрогели. Исследованы эффекты металлов на процессы миграции и пролиферации фибробластов кожи человека и эмбриональных мышечных фибробластов линии 3T3 в составе композиционных гидрогелей. Сравнение регенеративной активности однокомпонентного гидрогеля и гидрогеля, допированного ионами цинка, на модели эксцизионной раны крысы показало, что добавка цинка не ингибирует процессы новообразования дермы и эпителия кожи, при этом — существенно стимулирует миграцию лейкоцитов в область раны. Результаты свидетельствуют о том, что цинк в составе гидрогеля желатина проявляет биоактивность, влияет на скорость прохождения фаз раневого процесса и обладает иммуномодулирующим действием.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета (КФУ) среди ведущих мировых научно-образовательных центров и с участием ООО «Биомедтех КФУ». Использовано оборудование Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ.*

**Льондуп А.В., Максимова Н.В., Мельниченко Г.А., Помыткин И.А., Клабуков И.Д.**

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) lyundup@gmail.com

#### **АУТОЛОГИЧНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ АКТИВАТОР ЭПИТЕЛИЗАЦИИ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

Синдром диабетической стопы (СДС) является тяжелым осложнением диабета и общей причиной нетравматической ампутации. Патологически низкая скорость закрытия раны является отличительной чертой СДС. Целью работы было изучение влияния наружного введения аутологичных МСК костного мозга на скорость эпителизации язвы. Пилотное клиническое исследование было выполнено в Сеченовском университете на 3 пациентах с размерами язв 4,2 см<sup>2</sup>, 24,0 см<sup>2</sup> и 42,0 см<sup>2</sup>. Однократное наружное введение МСК привело к достоверному 8-кратному увеличению скорости эпителизации в первую неделю и 5-кратному в первые 3 нед. по сравнению со скоростью эпителизации до применения МСК ( $p = 0,037$ ). Средняя скорость эпителизации до полного закрытия язвы была достоверно выше в 2.2 раза, чем скорость эпителизации до применения МСК ( $p = 0,0044$ ). Биохимические параметры пациентов 1–3 достоверно не отличались в течение всего периода наблюдения, что позволяет утверждать,



что эффект ускорения эпителизации связан только с применением МСК. Таким образом, аутологичные МСК являются эффективным средством ускорения эпителизации диабетической язвы даже при однократном применении. Клеточные технологии являются новым многообещающим подходом к лечению заболевания, для которого не существует эффективных фармакологических методов лечения.

**Мавликеев М.О.<sup>1</sup>, Плотников М.В.<sup>2</sup>,  
Максимов А.В.<sup>2</sup>, Муртазин А.И.<sup>3</sup>,  
Гафиятуллина Г.Р.<sup>1</sup>, Титова А.А.<sup>1</sup>,  
Абызова М.С.<sup>3</sup>, Сахапов Д.И.<sup>1</sup>,  
Гумерова А.А.<sup>1</sup>, Деев Р.В.<sup>4</sup>, Киясов А.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Республики Татарстан

<sup>3</sup> Казанский государственный медицинский университет

<sup>4</sup> ПАО «Институт стволовых клеток человека»  
mmavlikeev@gmail.com

#### **ПОИСК МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) занимают второе место по распространённости в мире среди сердечно-сосудистых заболеваний. Рядом масштабных исследований продемонстрирован положительный потенциал применения клеточных и генных препаратов, стимулирующих неоангиогенез. Однако на данный момент отсутствуют объективные морфологические критерии оценки эффективности результатов терапевтического ангиогенеза. Цель исследования – выявление патоморфологических показателей, способных служить объективными показателями для оценки результатов генно-клеточной терапии ХОЗАНК различного генеза. В качестве материала были использованы биоптаты икроножной мышцы 45 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей IIБ степени (по А.В. Покровскому) с различными нозологиями (дистальный атеросклероз, многоэтажный атеросклероз, многоэтажный атеросклероз в сочетании с синдромом Лериша, многоэтажный атеросклероз в сочетании с синдромом Такаюсу, дистальный атеросклероз в сочетании с болезнью Бюргера) возрастом 41–73 лет и длительностью заболевания более 2 лет без сопутствующего сахарного диабета. Контрольные три биоптата были взяты у здоровых лиц. Парафиновые срезы биоптатов окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, иммуногистохимически с антителами к CD34. На окрашенных срезах производили оценку капиллярной плотности (КП), доли мышечных трубочек (ДМТ), относительной площади соединительной ткани. Производился анализ динамики морфологических показателей в зависимости от нозологии, возраста и длительности заболевания. Морфометрический анализ выявил отсутствие статистически значимых различий КП между различными нозологиями, при этом соотношение «количество капилляров/количество мышечных волокон» при ХОЗАНК было достоверно ниже ( $1,93 \pm 0,48$  против  $2,91 \pm 0,84$  в норме,  $p < 0,05$ ) и имело тенденцию к снижению с возрастом и неболь-

шому повышению при присоединении воспалительного компонента – при сочетании синдрома Такаюсу и атеросклероза выявлена сильная положительная корреляция ( $r = 0,894427$ ,  $p < 0,05$ ) между возрастом и КП, что может объясняться ангиогенным влиянием провоспалительных цитокинов. Установлено, что при атеросклеротическом поражении степень фиброза значимо не меняется по мере прогрессирования заболевания, при этом неуклонно возрастает при сочетании с синдромом Такаюсу и болезнью Бюргера. При этом относительная площадь соединительной ткани при ХОЗАНК выше, чем в норме ( $3,38 \pm 1,91\%$  против  $0,79 \pm 0,89\%$ ,  $p < 0,05$ ). Нам не удалось выявить какой-либо тенденции динамики ДМТ в зависимости от анализируемых показателей, однако их доля была статистически значимо выше, чем в норме ( $5,14 \pm 5,11\%$  против  $0,79 \pm 1,06\%$ ,  $p < 0,05$ ). ДМТ отражает регенераторный ответ мышечных волокон и должно учитываться индивидуально для каждого пациента, которому назначается ангиогенный препарат. Таким образом, при морфологической оценке результатов терапевтического ангиогенеза следует ориентироваться на динамику КП и фиброза, исключая случаи с сочетанными аутоиммунными поражениями.

Финансирование исследования: Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (14-15-00916) и при поддержке программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидий, выделенных Казанским федеральным университетом по государственному заданию

**Макаров А.В.<sup>1</sup>, Аполихина И.А.<sup>1</sup>,  
Саидова А.С.<sup>1</sup>, Попов В.К.<sup>2</sup>,  
Фатхудинов Т.Х.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России

<sup>2</sup> Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН  
anvitmak@yandex.ru

#### **ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ**

Поиск новых методов лечения урогинекологических заболеваний является высоко актуальной задачей. Изучение изменений, возникающих при трансплантации тканеинженерных конструкций, как одного из методов коррекции патологии малого таза, является необходимым условием в комплексе доклинических исследований. Целью настоящего исследования является разработка инъекционной тканеинженерной конструкции (ТИК) для регенеративной терапии ряда гинекологических заболеваний, сопровождающихся несостоятельностью мышечных и соединительных тканей малого таза. Для этого предлагается использовать синтетические биорезорбируемые полимерные носители как в качестве объемобразующего агента, так и в качестве матричной конструкции, содержащей рекомбинантный FGFb и аллогенные МСК, являющиеся активными индукторами ангиогенеза и репаративной регенерации. Разработаны методы формирования плотных с гладкой поверхностью и пористых с развитой поверхностью биорезорбируемых микроносителей размером от 50 до 200 мкм из полимеров гомологического ряда алифатических

полиэфиров. Проведен анализ структуры и морфологии полученных полимерных микроносителей. Получены и охарактеризованы культуры мультипотентных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика человека. С помощью полученных клеточных культур изучены цитотоксические (в соответствии с действующим ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009) и адгезивные свойства разработанных микроносителей, а также влияние их на динамику экспансии и фенотипические свойства МСК. В результате выполнения проекта разработана методика получения инъекционной ТИК на основе микрочастиц поликапролактона (ПКЛ), импрегнированных рекомбинантным FGFb, и заселенных МСК. На основании исследований цитотоксичности, адгезивных свойств и скорости резорбции были выбраны микрочастицы из ПКЛ. Проведено исследование биосовместимости образцов на экспериментальной модели подкожной трансплантации, а специфическая активность ТИК была изучена на модели стрессового недержания мочи у крыс. В результате была продемонстрирована высокая эффективность предложенного подхода по сравнению с коммерческим объемобразующим препаратом. Но на основании полученных результатов о повышении коллаген синтетической активности тканей в области трансплантации при использовании разработанной ТИК, есть основания предполагать, что на отдаленных сроках это ограничит миграцию микрочастиц и пролонгирует терапевтические эффекты.

**Макаров М.С., Боровкова Н.В.,  
Сторожева М.В., Пономарев И.Н.**

*ГБУЗ г. Москвы*

*«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы»  
mcsimmc@yandex.ru*

#### **РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ В СОСТАВЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПОВЯЗОК**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Наночастицы серебра способны стабилизировать тромбоциты человека на ранних стадиях адгезии, препятствуя их массовой дегрануляции. Этот эффект может быть использован при создании тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В работе использовали тромбоциты, выделенные из цельной крови доноров. После внесения тромбоцитов коллагеновые повязки площадью 4–5 см<sup>2</sup> экспонировали при 37°C в течение 10 мин. для стимуляции адгезии, затем добавляли наносеребро до конечной концентрации 5 мкМ наносеребра в каждой дозе. В присутствии наночастиц коллагеновые повязки с тромбоцитами экспонировали при 37°C в течение 30 мин., после чего удаляли весь остаточный объем дозы с неадгезировавшими тромбоцитами. Выделение компонентов гранул за пределы стабилизированных тромбоцитов осуществляли с помощью криодеструкции. Рост-стимулирующий эффект исследовали на примере культуры МСК тканевых доноров. Анализ биологической полноценности тромбоцитов и МСК, оценку количества клеток на коллагеновых повязках проводили с помощью оригинальных методов, основанных на витальном окрашивании клеток и их исследовании во флуоресцентном микроскопе.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Общее содержание стабилизированных тромбоцитов с гранулами в опытных коллагеновых повязках варьировало от 30 до 550 млн из

расчета на 100 тыс. клеток МСК. При сравнении общего числа МСК (тыс/см<sup>2</sup>) в опыте и в контроле (повязки без тромбоцитов) через 3 сут. культивирования установлено, что на повязках, содержащих до 170 млн тромбоцитов с гранулами, наблюдался выраженный рост-стимулирующий эффект. Так, если в контроле среднее число клеток составляло 6,4±0,9 тыс/см<sup>2</sup>, то при 40 млн стабилизированных тромбоцитов с гранулами этот показатель достигал 8,5±0,4 тыс/см<sup>2</sup>, при 80 млн – 12,1±0,6 тыс/см<sup>2</sup>, при 100 млн – 15,3±0,9 тыс/см<sup>2</sup>, при 150 млн – 9,0±0,4 тыс/см<sup>2</sup>. В целом, 30–58 млн стабилизированных тромбоцитов увеличивали индекс пролиферации МСК в 1,75 раза, 60–90 млн – в 2,2 раза, 96–120 млн – в 2,6 раза, 140–170 млн – в 1,2 раза. Таким образом, в диапазоне 30–120 млн стабилизированных тромбоцитов на 100 тыс. МСК наблюдался выраженный дозозависимый эффект стимуляции роста клеток *in vitro*. При 120–170 млн тромбоцитов с гранулами ростовой эффект снижался, а при 180–240 млн индекс пролиферации МСК был уже меньше, чем в контроле. Максимальное подавление роста отмечено в опытах с 500–550 млн стабилизированных тромбоцитов, где число МСК на повязках было в 3–4 раза снижено по сравнению с контролем; в опытных образцах у многих клеток наблюдалось нарушение адгезивной и секреторной активности. При этом на дне чашки Петри (вне повязки) клетки сохраняли нормальную пролиферативную активность и структурную целостность.

**ВЫВОДЫ.** Концентрация 5 мкМ наносеребра является адекватной для стабилизации тромбоцитов с гранулами на коллагене. 60–120 млн стабилизированных тромбоцитов в расчете на 100 тыс. клеток позволяет в 2 и более раз увеличить пролиферативную активность МСК на коллагеновых матриксах.

**Макашова Е.Е., Зубов П.М., Зубова О.Л.,  
Бабийчук Л.А.**

*Институт проблем криобиологии  
и криомедицины НАН Украины  
olena.makashova@gmail.com*

#### **РОЛЬ ГЛУТАТИОНА ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** При криоконсервировании с ДМСО ядродержащих (ЯСК), в том числе и гемопозитических прогениторных клеток (ГПК) происходит целый комплекс структурно-функциональных изменений, способных инициировать их гибель. Одной из причин этого может быть увеличение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках. Особенно данные процессы могут усиливаться после переноса клеток в кровеносное русло, что должно учитываться при расчете терапевтической дозы препарата перед введением реципиенту. В связи с этим, оценка сохранности, жизнеспособности и количества клеток с избыточным содержанием АФК после инкубации клеток в условиях моделирующих физиологические, даст возможность более объективно определить состояние ЯСК/ГПК КК после переноса в кровеносное русло реципиента, а добавление к среде замораживания глутатиона может снизить интенсивность образования АФК.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В выделенную полиглюкином фракцию ЯСК вносили ДМСО до конечных кон-

центраций в пробе 5, 7,5 и 10%. Глутатион использовали в концентрациях 1 и 3 мМ. Замораживали со скоростью 1–3°C в минуту до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием моноклональных антител (CD45FITC, CD34PE) и ДНК-красителя 7-AAD методом проточной цитофлуориметрии. Для определения уровня АФК в клетках использовали 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCFH2-DA). Стадии апоптоза/некроза клеток определяли цитофлуориметрически с использованием комбинации AnnexinV и 7-AAD. Моделирование трансфузии проводили путем переноса части клеток в раствор Хенкса и инкубации их при 37°C в течение часа.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ сохранности и жизнеспособности ЯСК/ГПК, после перенесения в условия, моделирующие физиологические, показал, что максимальный криозащитный эффект проявляет ДМСО в концентрации 7,5% и 10%. Анализ стадий апоптоза/некроза после часовой инкубации в растворе Хенкса выявил увеличение количества некротических клеток (AnnexinV-/7AAD+) во всех образцах в 2 раза по сравнению с данными, полученными сразу после размораживания, а также снижение количества неповрежденных клеток (AnnexinV-/7AAD-) на 10–30%. Наибольшее количество живых клеток наблюдалось в пробах с 7,5 и 10% ДМСО. Анализ влияния 1 и 3 ммоль глутатиона в комбинации с 7,5 и 10% ДМСО на ЯСК КК в условиях, моделирующих физиологические, продемонстрировал увеличение количества сохраненных ЯСК на 20–28% и ГПК – на 17–26% по сравнению с пробами, к которым не был добавлен антиоксидант. В данных образцах наблюдалось также увеличение уровня жизнеспособных ЯСК на 25–30% и ГПК – на 22–28%. Количество некротических клеток уменьшилось на 18–32%, а живых неповрежденных клеток увеличивалось на 17–22%. Таким образом, добавление глутатиона к криозащитным средам, способствует достоверному уменьшению количества АФК и предупреждает развитие окислительного стресса, что даст возможность сохранения количественного и качественного состава клеточных препаратов КК после переноса в кровеносное русло реципиента.

**Шуман Е.А.<sup>1</sup>, Коротков А.В.<sup>2</sup>, Макеев О.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

larim@mail.ru

### **ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К КОРРЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОРОНАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

Сосудистые заболевания и прежде всего ишемическая болезнь сердца являются одной из главных причин смертности взрослого населения промышленно развитых стран. Означенное связано с геном-обусловленным выключением экспрессии факторов неангиогенеза. Однако введение отдельных генов, как было показано в целом ряде плацебо-контролируемых исследований, не сопровождалось значимым клиническим эффектом, что обусловлено участием в образовании полноценной сосудистой сети продуктов, кодируемых более чем тридцатью генами. Целью исследования стал поиск путей достижения полноценного неангиогенеза за счет активации

комплекса факторов роста, участвующих в ангиогенезе. Эксперименты проводили на кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,8–3,2 кг и возрастом 1–1,2 года. Животным, на фоне неполной окклюзии передней нисходящей артерии сердца интрамиокардиально однократно вводили встроенные в плазмидные векторы гены факторов роста VEGF165 (группа № 1) в концентрации 400 мкг/мл физиологического раствора, из расчета 50 мкг/см<sup>2</sup> зоны ишемии равномерно по всей зоне ишемии с добавлением адьюванта или комплекс плазмидных векторов четырех генов HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225 (группа № 2) в концентрации 400 мкг/мл физиологического раствора из расчета 100 мкг ДНК на см<sup>2</sup> зоны ишемии с добавлением адьюванта. В качестве адьюванта использовали 2-диметиламиноэтанол в концентрации 2,5 ммоль/л. Контрольной группе животных (n = 10) вводили только адьювант в соответствующем объеме физраствора. Уровень ангиогенеза оценивали на 30-е сут. после операции. Кровеносные сосуды миокарда и их взаимоотношения с сердечными мышечными волокнами выявляли с помощью метода внутрисосудистой инъекции контрастными взвешями с последующей гистологической обработкой. Изучение рО<sub>2</sub> в зоне повреждения проводили полярографическим методом. Полученные результаты свидетельствуют, что трансфекция геном VEGF-165 сопровождается развитием микроциркуляторного русла (число капилляров, длина капилляров и площадь обменной поверхности капилляров возросло на 14,0, 22,3 и 28,1% по отношению к контрольной группе животных (p < 0.05), что на 30-е сут. привело к возрастанию рО<sub>2</sub> в зоне ишемии на 79,4%, p < 0.05). Трансфекция клеток комбинацией четырех генов оказывает более выраженный эффект – число капилляров, их длина и площадь обменной поверхности капилляров возросли на 40,1, 89,3 и 100% соответственно по отношению к контрольной группе животных (p < 0.05), что сопровождалось возрастанием рО<sub>2</sub> в зоне ишемии на 150%, p < 0.05. Наряду с формированием капиллярной сети, трансфекция комбинацией факторов роста сосудов сопровождается образованием артериол, а также формированием анастомозов между новообразованными сосудами и сосудами неповрежденной ишемией ткани сердца. Таким образом, использование комплекса четырех генов позволяет эффективно стимулировать ангиогенез и remodelировать сосудистую сеть в ишемизированном миокарде

Финансирование исследования: Бюджет.

**Маклакова И.Ю.<sup>1,2</sup>, Гребнев Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Леонтьев С.Л.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России

<sup>2</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

makliu@mail.ru

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины. В последние годы доказан феномен

слияния гемопоэтических клеток со специализированными клетками кишечного эпителия. При этом было показано, что этот процесс не инициирует развитие опухоли. Учитывая свойства плацентарных ММСК и ГСК, их совместное введение представляется перспективным и может обеспечить регенерацию после воздействия экстремального фактора. Эксперименты выполнены на 90 зрелых лабораторных мышах-самцах в возрасте 6–8 мес. с массой 18–22 г и 90 старых мышах-самцах в возрасте 20–22 мес. с массой 25–30 г. Зрелые и старые лабораторные животные были разделены на две группы соответственно. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы. Животным опытной подгруппы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной подгруппы вводили 0,9% раствор NaCl. Внутривенные введения осуществлялись через 1 ч. после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сут. после облучения. Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1. Мощность поглощенной дозы ИИ составила 4,0 Гр. Оценка регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки осуществлялась с помощью расчетов индекса пролиферации, апоптотического индекса, средней клеточности в одной крипте. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода Aror Tag® Peroxidase In situ Oligo Ligation (ISOL). В физиологических условиях и в условиях воздействия ИИ сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых животных сопровождается увеличением содержания эпителиоцитов крипт тощей кишки. В физиологических условиях у зрелых животных этот эффект реализуется через увеличение пролиферативной активности эпителиоцитов, в то время как у старых — через ингибирование апоптоза. В условиях воздействия экстремальных факторов увеличение содержания клеточной популяции крипт у зрелых животных достигается за счет повышения пролиферативной активности и угнетения апоптоза эпителиоцитов, а в старом организме — за счет ингибирования апоптоза.

Финансирование исследования: *ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.*

**Максимчик П.В.<sup>1</sup>, Абдрахманов А.А.<sup>2</sup>, Животовский Б.Д.<sup>1,3</sup>, Гогвадзе В.Г.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова,

Факультет фундаментальной медицины

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова,

Факультет биоинженерии и биоинформатики

<sup>3</sup> Каролинский институт,

Отделение токсикологии, Факультет медицины окружающей среды

pollymaxbox@gmail.com

### **ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Метаболическое репрограммирование большинства типа опухолей можно охарактеризовать двумя основными изменениями в энергообмене клеток:

преобладанием гликолиза над окислительным фосфорилированием и повышением потребления глутамина в качестве энергетического субстрата. В связи с тем, что большинство опухолей характеризуются значительным гликолитическим сдвигом, во многих случаях ингибирование метаболизма опухолевых клеток путем подавления гликолиза считается перспективным подходом к терапии опухолей. Так, 2-дезоксиглюкозу (2-ДГ), ингибитор гексокиназы, рассматривают как потенциальный агент для комбинированной противоопухолевой терапии. Однако, в последнее время выявлены новые механизмы действия 2-ДГ и показано, что 2-ДГ помимо энергетики клетки затрагивает процессы N-гликозилирования белков, что также необходимо учитывать при выборе мишенной противоопухолевой терапии. В работе использовались человеческие клеточные линии нейробластомы SK-N-BE (2) и колоректального рака HCT 116. Для индукции апоптоза были использованы применяемые в клинике цитотоксические препараты цисплатин и этопозид. Для оценки клеточной гибели были использованы методы проточной цитофлуориметрии (анализ SubG1, окраска Аннексин V-пропидий йодид), вестерн-блот анализ (оценка расщепления каспаз и их субстратов, выход цитохрома с из митохондрий), оценка энергетики опухолевых клеток была проведена с помощью анализатора SeahorseXF96 и хемилюминесцентного анализа уровня АТФ. Воздействие 2-ДГ вызывало апоптоз в клетках нейробластомы SK-N-BE (2) и усиливало клеточную гибель, вызванную цисплатином. Однако, в клетках HCT116 2-ДГ не вызывала клеточную смерть и, напротив, подавляла апоптоз, вызванный цисплатином и этопозидом. При сравнении энергетики опухолей было выявлено, что SK-N-BE (2) значительно чувствительнее к подавлению продукции АТФ 2-дезоксиглюкозой, чем HCT116, а клеточное дыхание HCT116 значительно превышало дыхание клеток нейробластомы. Согласно анализу накопления маркера эндоплазматического стресса Bip/GRP78 в обеих линиях 2-ДГ вызывала стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) — через нарушение N-гликозилирования. Добавление маннозы, ингибитора ЭПР-стресса, подавляло апоптоз в SK-N-BE (2), вызываемый 2-ДГ, из чего следует, что стимуляция клеточной гибели является следствием индукции стресса ЭПР. В клетках HCT116 индукция стресса ЭПР при воздействии 2-ДГ приводила к аутофагии (оцениваемой по накоплению второй формы белка LC3-II и деградации белка p62). Добавление маннозы отменяло защиту клеток HCT116 от апоптоза. Данные о роли аутофагии были подтверждены использованием ингибитора процесса бафиломицина, который отменял защиту 2-ДГ в клетках HCT116 и активатора аутофагии рапамицина, который подавлял апоптоз, вызванный цисплатином и 2-ДГ, в клетках SK-N-BE (2). Таким образом, сочетанное действие традиционно применяемых противоопухолевых препаратов вместе с модуляторами клеточной энергетики и аутофагии может служить эффективной стратегией элиминирования опухолевых клеток.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00768 «Дыхательная цепь митохондрий — мишень противоопухолевой терапии».*

**Маланханова Т.Б., Малахова А.А.,  
Закиян С.М.**

ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии  
и генетики» СО РАН  
amal@bionet.nsc.ru

### **ОПТИМИЗАЦИЯ ИНСТРУМЕНТОВ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

Болезнь Хантингтона — это наследственное нейродегенеративное заболевание человека, причиной которого является динамическая мутация удлинения тракта тринуклеотидных повторов CAG в кодирующей части первого экзона гена НТТ (Huntingtin). Экспрессия мутантного аллеля приводит к синтезу токсичной формы белка мНТТ, имеющей удлинённый полиглутаминовый тракт (более 35 а.о.) и склонной к образованию агрегатов внутри клетки. Однако механизм патологического действия мНТТ, приводящий к нейродегенеративным изменениям в специфических областях головного мозга, остается слабо изученным. Моделирование наследственных заболеваний человека *in vitro* имеет большие перспективы в современной биомедицине. Используя методы редактирования генома, можно создавать панели изогенных клеточных линий, различающихся между собой лишь мутациями в определенных генах, ответственных за развитие заболевания. При этом исходные клетки, не несущие мутации, будут являться идеальным «здоровым» контролем. Нами были разработаны и успешно применены молекулярные инструменты на основе CRISPR/Cas9, позволяющие вносить удлиненный тракт повторов CAG в первый экзон гена НТТ культивируемых клеток. Спейсерная последовательность CRISPR/Cas9 обеспечивает узнавание и гидролиз геномной ДНК на расстоянии 37 нуклеотидов от начала тракта тринуклеотидных повторов. Создан набор донорных молекул, несущих 69 и 148 повторов CAG, фланкированных плечами гомологии к первому экзону гена НТТ. Для предотвращения разрезания донорной молекулы ДНК и повторного гидролиза геномной ДНК рекомбинантного аллеля в донорную последовательность была внесена однонуклеотидная замена, которая изменяет район узнавания Cas9 PAM с AGG на AAG. Данная замена в то же время является синонимичной, т. е. не изменяет аминокислотную последовательность белка (кодон CTG меняется на TTG (Leu)). При выборе нуклеотида для замены учитывалась частота использования кодонов. Эффективность работы созданной системы редактирования генома была успешно подтверждена на клетках линии HEK293FT. Получены клоны единичных клеток, гомо- и гетерозиготных по вносимой мутации. Секвенирование подтвердило внесение тракта повторов и синонимичной замены в геном клеток. Разработанная нами система позволяет использовать ДНК-пробы для детекции внесения целевой мутации, что облегчает работу с культурами клеток, с трудом поддающихся субклонированию, таких как плюрипотентные стволовые клетки, нейробласта человека, культуры нейрональных предшественников.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10128).*

**Малашичева А.Б., Костарева А.А.,  
Худяков А.А.**

Национальный медицинский исследовательский  
центр им. В.А. Алмазова  
amalashicheva@gmail.com

### **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ ПРИ ПОМОЩИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК**

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) — наследственное заболевание, которое характеризуется замещением сердечной мышцы жировой, либо фиброзной тканью. Генетические исследования обнаружили, что мутации в генах, кодирующих белки десмосом, в частности, в гене RCP2, кодирующем белок плакофиллин-2, приводят к развитию АКМП. Механизмы, посредством которых мутация в структурном белке десмосомы обуславливает нарушение дифференцировки клеток сердца, остаются слабо изученными. Целью данного исследования было получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки от пациентов с АКМП с мутацией в гене RCP2 и на модели кардиогенной дифференцировки оценить влияние мутаций плакофиллина на дифференцировку кардиомиоцитов. Одним из кандидатных сигнальных путей, вовлечённых в нарушение дифференцировки при мутациях в RCP2, считают сигнальный путь Wnt. Были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, от пациентов с мутациями в гене RCP2. Показано, что в клетках, несущих мутантный ген RCP2, снижена транскрипционная активность основного участника сигнального пути Wnt —  $\beta$ -катенина, а также экспрессия транскрипционных мишеней  $\beta$ -катенина — SOX2 и SOX9. Кроме того, изменена активность сигнальных путей Notch и Hippo, также вовлечённых в дифференцировку клеток. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что изменение функционирования сигнального пути Wnt является одним из ключевых событий в патогенезе аритмогенной кардиомиопатии.

Финансирование исследования: *исследование поддержано грантом РФФ 000745п*

**Глухов А.А., Андреев А.А., Малкина Н.А.**

Воронежский государственный медицинский  
университет им. Н.Н. Бурденко  
nat76620664@mail.ru

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛАГЕНА В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Проблема лечения остеомиелита остается актуальной, что обусловлено его встречаемостью у каждого 10 стационарного больного с хирургической инфекцией. В 15–45% случаев острый остеомиелит переходит в хроническую форму, которая приводит к развитию рецидивов в 30% случаев, инвалидизации у 90% больных.

**ЦЕЛЬ.** Улучшение результатов лечения хронического остеомиелита, основанного на сочетанном использовании ультразвуковой обработки и синтезированного гидролизата коллагена.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования проведены на 210 белых крысах, которые были разделены на 2 контрольные и 3 опытные группы. В 1-й контрольной

группе лечение не проводилось. Во 2-й контрольной и опытных группах осуществлялась хирургическая санация гнойного очага. В 1-й опытной группе выполняли ультразвуковую обработку. Во 2-й опытной группе проводили хирургическую санацию с последующим внесением в костную полость коллагена. В 3-й опытной группе – сочетанное применение ультразвуковой обработки очага и внесение коллагена. Для оценки динамики лечения на 7-е, 14-е, 28-е, 60-е, 90-е и 120-е сут. оценивали динамику изменения окислительного стресса (МДА, ДНГФ) и морфометрических показателей (межтрабекулярное расстояние, фракция костного участка, средняя толщина трабекул).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В контрольных группах на все исследуемые сроки уровень МДА был высоким. В опытных группах наблюдается тенденция к снижению. К 120-м сут. эти показатели уменьшились в 1 опытной группе на 59,2%, во 2-й опытной – 64,3%, в 3-й опытной – 74,2%. Уровень ДНГФ в 1-й и 2-й контрольных группах в среднем был выше в 2 раза, чем в опытных. В опытных группах выявлено достоверное снижение значений. В 1-й опытной группе показатели уменьшились на 53,5%, во 2-й опытной – на 55,3%, в 3-й опытной – на 57,1%. Подавление антиоксидантной системы защиты и высокой активности свободнорадикальных процессов привело к активации окислительного стресса. В контрольных группах при исследовании выявлено снижение резервных возможностей АОС и усиление интоксикации. В опытных группах на фоне проводимого лечения наблюдается сбалансированность процессов окислительного стресса и антиоксидантной защиты. При изучении межтрабекулярного расстояния в контрольных группах на все исследуемые сроки, выявлено увеличение исследуемого показателя. К 120-м сут. межтрабекулярное расстояние в 1-й опытной группе уменьшилось на 99,6%, во 2-й опытной – на 98,2%, в 3-й опытной – на 97,3%. При изучении фракции костного участка в контрольных группах показатели были ниже, чем в опытных. К 120-м сут. показатели увеличились в 1-й опытной группе на 108,5%, во 2-й опытной – на 145,3%, в 3-й опытной – на 100%. При исследовании средней толщины трабекул в контрольных группах значения были минимальные. К 120-м сут. в 1-й опытной группе показатель увеличился на 100,4%, во 2-й опытной – на 100,1%, в 3-й опытной – на 123,8%, что свидетельствует об ускоренном образовании костной мозоли в группе с сочетанным применением ультразвуковой обработки и синтезированного гидролизата коллагена.

**ВЫВОДЫ.** При проведении комплексного лечения с использованием ультразвуковой обработки и синтезированного гидролизата коллагена, происходит заметное усиление антиоксидантной системы защиты, тем самым наблюдается купирование окислительного стресса. Морфометрические значения при комплексном лечении хронического остеомиелита к 120-м сут. характеризуются уменьшением межтрабекулярного расстояния, увеличением фракции костного участка и толщины трабекул, что свидетельствует об ускорении образования костной мозоли и предотвращении редификации костных структур.

**Марахова И.И., Домнина А.П.,  
Виноградова Т.А., Земелько В.И.,  
Пуговкина Н.А., Шатрова А.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
iim@incras.ru

### **ИЗМЕНЕНИЯ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА, СВЯЗАННЫЕ С РОСТОМ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека широко используются для анализа сигнальных событий, которые участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, в связи с чем возникает необходимость использовать в экспериментах функционально стабильные клетки. В работе выявлены связанные с уровнем пролиферации культур МСК человека изменения таких параметров ионного гомеостаза клеток как содержание калия и натрия и потоки калия через мембрану, которые являются адекватными критериями функционального статуса клеток. Показано, что в оптимальных условиях культивирования, в процессе роста культуры одного пассажа внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок снижается с 1,1–1,0 до 0,7–0,6 ммоль/г, тогда как содержание натрия практически не изменяется. При высоких плотностях культуры снижается ингибируемый убаином поток калия, что свидетельствует о снижении активности Na,K-насоса. Изменения транспорта и содержания калия не связаны длительно с ростом культуры и обусловлены увеличением плотности клеточного монослоя: они проявляются на 2-е сут. после высева клеток в культуру с разной исходной плотностью. Охарактеризованы изменения транспорта калия, связанные с возрастом культуры МСК человека. В культурах ранних пассажей (до 7–8-го) внутриклеточное содержание и потоки калия выше, чем в культурах поздних пассажей (более 12-го пассажа). Анализ уровня пролиферации в культурах МСК человека разной плотности и разного возраста показал, что снижение внутриклеточного содержания коррелирует с накоплением клеток в фазе G1 клеточного цикла и свидетельствует о снижении уровня пролиферации клеток в культуре. Проведено исследование ионного гомеостаза у МСК человека в процессе остановки размножения, индуцированной окислительным стрессом. Обнаружено, что необратимая стресс-индуцированная остановка пролиферации МСК человека и накопление клеток в S и G2/M фазах цикла не затрагивает зависимые от плотности изменения внутриклеточного содержания калия, но сопровождается повышенным внутриклеточным содержанием натрия, высокой активностью Na,K-насоса, снижением отношения содержания калия и натрия в клетке. Сделан вывод, что в отличие от других ионов, которые вовлечены в процессы регуляции клеточного цикла, являясь элементами внутриклеточной сигнализации, калий, как основной внутриклеточный катион, участвует в регуляции объема клетки и содержания в ней воды и контролирует процессы роста клеток на пререпликативной G1-стадии клеточного цикла. Результаты исследования и данные в литературе, характеризующие транспорт ионов у клеток постоянных линий в культуре (Веренинов, Марахова, 1986), дают основание считать, что высокое внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок является признаком высокого

пролиферативного потенциала клеточной культуры и может служить маркером функционального статуса стволовых клеток.

Финансирование исследования: Программа Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 1-7П), Российский Научный Фонд (грант № 14-50-00068).

#### Марквичева Е.А.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН  
lemarkv@hotmail.com

#### БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Биодеградируемые микроносители (МН), гидрогели (ГГ), микро- и нано волокна являются перспективными матриксами для тканевой инженерии. Они могут быть загружены лекарствами, биоактивными пептидами, ростовыми факторами. Цель работы – получение композитных матрикс (скаффолдов), в частности МН (200–300  $\mu\text{m}$ ) на основе полиэфиров, макропористых гидрогелей, макро- и нановолокон и изучение поведения клеток в зависимости от типа матрикса и свойств его поверхности. Все скаффолды были сформированы из биосовместимых материалов, таких как полилактиды (полимолочная кислота PLLA, PDLLA), полисахариды (хитозан, гиалуроновая кислота), поливинилового спирта. Был разработан новый подход для получения гидрогелей на основе хитозана/гиалуроновой кислоты с включенными в него наночастицами гидроксиапатита. В качестве модельных клеток были использованы клетки фибробластов (L929), клетки остеосаркомы человека (HOS), мезенхимальные стромальные клетки человека (MSC), выделенные из жировой ткани. Все матриксы были модифицированы для того, чтобы улучшить адгезию клеток, их распластывание и пролиферацию. В частности, МН были покрыты поликатионами, в частности для этой цели использовали хитозан, графт-сополимеры хитозана с поливиниловым спиртом (chitosan-g-PVA), графт-сополимеры хитозана с желатином и молочной кислотой (chitosan-gelatin-PLA), поли(2-диметилметакрилат (PDMAEMA). Композитные нановолокна из сополимера PVA-g-chitosan (d 200 нм) были получены методом электроформования. Для изучения цитотоксичности полученных матрикс были использованы так называемые «экстракт- и контакт-тесты». Рост клеток в/на матриксах мониторили с помощью оптической, конфокальной лазерной и электронной сканирующей микроскопии. Количество жизнеспособных клеток определяли посредством МТТ-теста на 2, 4 и 7 сут. культивирования. Было обнаружено, что прикрепление, распластывание, рост и пролиферация клеток зависели от полимерного состава матрикс. Было показано, что увеличение пролиферации клеток МСК и HOS в гидрогелях, загруженных гидроксиапатитом, связано с увеличением содержания последнего в интервале 1–10% (w/w). Полученные матриксы могут быть загружены ростовыми факторами (BMP-2) или биоактивными пептидами (TRAP-6) и другими биоактивными молекулами.

#### Маркитантова Ю.В.<sup>1</sup>, Акберова С.И.<sup>2</sup>, Рязцева А.А.<sup>3</sup>, Строева О.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

<sup>2</sup> Медицинский центр «Медквадрат»

<sup>3</sup> Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского  
yuliya.mark@gmail.com

#### ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ АКТИПОЛА РАЗВИТИЯ АПОПТОТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ РОГОВИЦЫ И КОНЬЮНКТИВЫ У КРЫС, ВЫЗВАННОГО ОСТРОЙ ГИПОКСИЕЙ *IN VIVO*

Ввиду возрастающего экологического неблагополучия, всё больше привлекают внимание факторы внешней среды, оказывающие повреждающее действие на организм, в том числе и на эпигенетическом уровне. Одним из таких факторов является гипоксия, которая может быть причиной широкого спектра функционально-метаболических нарушений в организме. Несмотря на многолетние исследования, многообразие аспектов этой проблемы оставляет многие вопросы нерешенными. Рядом с изучением последствий влияния гипоксии на ткани неотъемлемо стоит задача поиска средств защиты от ее повреждающего действия. Цель работы состояла в исследовании начальных процессов апоптотического поражения клеток тканей переднего сектора глаза – конъюнктивы и эпителии роговицы взрослых крыс в условиях острой гипобарической гипоксии, и после действия парааминобензойной кислоты в форме лекарственного препарата Актипол, в системе *in vivo*. Повреждающее действие гипоксии анализировали методом TUNEL. Восстановительные процессы оценивали по экспрессии маркера митоза – phospho-histoneH3 (Ser10), и маркера репарации ДНК –  $\gamma\text{H2A.Xphospho}$  (S139). В контрольной группе животных, не подвергавшихся действию гипоксии, в конъюнктиве и эпителии роговицы были идентифицированы одиночные TUNEL-позитивные клетки, которые в других тканях глаза не были зарегистрированы. После однократной гипоксии в конъюнктиве и эпителии роговицы наблюдалось увеличение количества апоптотических клеток. При двукратной гипоксии в конъюнктиве было обнаружено резкое возрастание площади поражения и интенсивности свечения TUNEL-позитивных клеток, по сравнению с контролем и однократной гипоксией. В эпителии роговицы, после двукратной гипоксии TUNEL-позитивные клетки были обнаружены на всем его протяжении. При этом была отмечена интенсификация митотической и репаративной активности клеток, выявляемая по экспрессии маркеров phospho-histoneH3 (Ser10) и  $\gamma\text{H2A.Xphospho}$  (S139). Интенсификация восстановительных процессов в эпителии роговицы показывает, что увеличение сеансов моделируемого типа гипоксии может вызывать в данной системе усиление повреждающего действия, что предполагает в случае истощения восстановительных ресурсов роговицы возможность развития последующей патологии. Различная реакция клеток конъюнктивы и эпителии роговицы по времени вступления в апоптоз и цикл пролиферации, предполагает различный статус кинетики клеточных популяций в этих обновляющихся системах. Обнаружено, что предварительное введение Актипола предотвращает процесс развития апоптоза на стадии введения препарата, сохраняя в повреждающих условиях гипоксии состояние кле-

ток конъюнктивы на уровне физиологической нормы. Таким образом, полученные нами в настоящей работе результаты показали, что парааминобензойная кислота в форме лекарственного препарата Актипол выступает в качестве эпигенетического регулятора восстановительных процессов в обновляющихся клеточных популяциях, таких как эпителий роговицы и конъюнктивы.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01114, с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.*

**Мартынова А.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Дальневосточный федеральный университет*

<sup>2</sup> *Тихоокеанский государственный медицинский университет*

*clinmicro@yandex.ru*

### **МИКРОРНК КАК РЕГУЛЯТОР РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА ПРИ СТРЕПТОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

Несмотря на достигнутые успехи, стрептококковая инфекция до сих пор остается значимой проблемой современной инфектологии и медицины внутренних органов. Не существует ни одной медицинской специальности, в поле зрения которой, не входили бы нозологические единицы, этиология которых так или иначе была бы связана с активацией патогенетического процесса, вызванных штаммами *Streptococcus pyogenes*, ключевой ролью которого является активация иммунного ответа. МикроРНК являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, воздействующими на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы, на продукцию антител и высвобождение медиаторов воспаления. Нарушение этой регуляции может приводить к формированию различных патологических состояний, в том числе и аутоиммунному воспалению. Кроме того, микроРНК играют ключевую роль в регуляции развития и функции четырех основных субпопуляций Т-хелперов.

**ЦЕЛЬ.** Изучить паттерн экспрессии микроРНК у пациентов с различными формами стрептококковой инфекции для оценки возможности использования в качестве предиктора развития аутоиммунного процесса и как новой молекулярной мишени при разработке таргетной терапии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Штаммы культур *Streptococcus pyogenes* Rosenbach ATCC1234 культивировались в течение суток, затем инактивировались при 56° в течение 2 ч. Обрабатывали культурой макрофаги, выделенные от пациентов со стрептококковой инфекцией, далее содержание РНК определяли методом qRT-PCR, были выбраны наиболее актуальные в развитии инфекционного процесса микроРНК: miR-155, miR-9, miR-124a, and miR-146a.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Скрининговое сравнительное исследование экспрессии микроРНК в альвеолярных макрофагах, присутствующих в очагах воспаления, у больных различными формами стрептококковых инфекций, с клиническими признаками развития аутоиммунного процесса, выявило общие для этих аутоиммунных заболеваний нарушения в экспрессии микроРНК: экспрессия miR-155 и miR-9 была повышена, а miR-124a и miR-146a — снижена.

**ВЫВОДЫ.** Полученные результаты позволяют предположить, что микроРНК действительно является значимым предиктором развития аутоиммунно-

го процесса, значимого в том числе и при изучении регенерации.

**Масгутов Р.Ф.<sup>1</sup>, Масгутова Г.А.<sup>2</sup>, Салафутдинов И.И.<sup>2</sup>, Сыромятникова В.Ю.<sup>2</sup>, Муллахметова А.Ф.<sup>2</sup>, Мухаметова Л.Р.<sup>2</sup>, Ризванов А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Республиканская клиническая больница*

<sup>2</sup> *Казанский (Приволжский) федеральный университет*

*galina2526@gmail.com*

### **ПРЯМАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ С VEGF И FGF2 СТИМУЛИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОВРЕЖДЕННОГО СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ**

Актуальность разработки методов стимуляции регенерации травматически поврежденных периферических нервов направленных на восстановление целостности нерва и васкуляризации обусловлена длительным восстановительным периодом и высокой частотой посттравматических осложнений, таких как потеря двигательной и чувствительной функции, что существенно снижает качество жизни пациента. В работе исследован результат прямой генной терапии с факторами роста VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста и FGF2 — фактор роста фибробластов-2 при травматическом повреждении седалищного нерва у крыс методами одномоментного рассечения/сшивания и аутонервной вставки протяженностью 5 мм. Было показано, что прямая генная терапия с VEGF и FGF2 стимулирует васкуляризацию нерва, что было зафиксировано на лазерном доплере (EasyLDI, Aimago) и подтверждено при гистологическом исследовании дистальных фрагментов поперечных срезов седалищного нерва, поддерживает выживание чувствительных нейронов спинального ганглия L5, оказывает нейропротекторное действие в отношении субпопуляции нейронов малого диаметра (болевые нейроны) и стимулирует восстановление двигательной функции оперированной конечности. Полученные нами результаты подтверждают существенную роль факторов роста в процессе посттравматической регенерации периферических нервов.

Финансирование исследования: *Исследование осуществлено в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (IDRFMEFI59414X0003) и Научно образовательного центра фармации Казанского (Приволжского) федерального университета.*



**Матвеева В.А.<sup>1</sup>, Артемьева Л.В.<sup>1</sup>,  
Матвеев А.Л.<sup>1</sup>, Чичерина Г.С.<sup>2</sup>,  
Потапова О.Ф.<sup>2</sup>, Майбородин И.В.<sup>1</sup>,  
Ефремов Я.А.<sup>3</sup>, Алешина Т.Е.<sup>3</sup>,  
Овсянникова Т.В.<sup>1</sup>, Морозов В.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>2</sup> Институт систематики и экологии животных  
СО РАН

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
vam@niboch.nsc.ru

### **КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЛОЯ ЭНДОМЕТРИЯ ЖЕНЩИН С УСТАНОВЛЕННЫМ ДИАГНОЗОМ ХРОНИЧЕСКИЙ ЭНДОМЕТРИТ**

Основной причиной репродуктивных потерь, занимающей одно из первых мест среди гинекологических заболеваний, является бесплодие, вызванное нарушением функций эндометрия. Лечение, направленное на исправление данной дисфункции, проводимое в настоящее время, не всегда эффективно. Одним из новых подходов в лечении бесплодия может стать клеточная терапия стволовыми клетками собственного эндометрия. Целью работы являлось получение стволовых клеток эндометрия женщин, страдающих вторичным бесплодием. Для получения стволовых клеток эндометрия использовали диагностические образцы пайпель-биопсии функционального слоя эндометрия женщин с установленным диагнозом эндометрит. Клетки выделяли методом ферментативной диссоциации и культивировали до третьего субкультивирования. По результатам световой микроскопии, проточной цитометрии и иммуноцитохимического окрашивания, культивируемые *in vitro*, клетки прикреплялись к пластику, имели фибробластоподобную морфологию, несли фенотип: CD14-, CD31-, CD34+/-, CD38-, CD45-, CD45RA-, HLA-DR-,  $\alpha$ -SMA-, CD326-, CD9+, CD71+, CD73+, CD90+, CD146+, пролиферировали до и после криоохранения, в присутствии специфических индукторов направленно дифференцировались в клетки костной, хрящевой, жировой тканей, что соответствует морфологии, фенотипу и функциональным свойствам мезенхимальных стволовых клеток эндометрия. Кроме того, экспрессия маркеров клеток CD146, CD34, VEGF2R, цитокератина 19 не исключает присутствия в исследуемых культурах мезенхимальных стволовых клеток перицитов, предшественников эндотелиальных и эпителиальных клеток. При трансплантации суспензий полученных клеток под капсулу почки овариоэктомированных мышей линии BALB/c, получающих гормональную поддержку (эстрадиол, прогестерон), наблюдали развитие сосудистой сети в местах введения клеток. После введения клеток в рог матки псевдобеременных самок мышей линии BALB/c наблюдали гипертрофию эндометрия, увеличение числа секреторирующих желез, усиление васкуляризации эндометрия и мышечной оболочки матки, в отдельных случаях – децидуализацию эндометрия в сравнении с контрольным рогом. Развитие капиллярно-сосудистой системы под капсулой почки, васкуляризация эндометрия и мышечной оболочки матки, образование новых функционально активных маточных желез, децидуализация эндометрия предположительно связаны с паракринным влиянием ростовых факторов, секреторируемых введенными клетками. Для определения механизмов восстанов-

ления ткани эндометрия с участием собственных стволовых клеток функционального слоя эндометрия и возможности использования их в лечении бесплодия, связанного с тонким эндометрием необходимы дальнейшие исследования.

**Машанова В.А., Камалова С.И.,  
Боровская Т.Г.**

НИИ фармакологии и регенеративной  
медицины им. Е.Д. Гольдберга  
ФГБНУ «Томский национальный  
исследовательский медицинский центр»  
lgrig2@mail.ru

### **СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СПЕРМАТОГЕННОЙ ТКАНИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ИСТОЧНИКОВ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПУЛА СПЕРМАТОГЕНЕЗА С ПОМОЩЬЮ АНТИОКСИДАНТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Токсические воздействия на стволовые сперматогонии могут быть причиной необратимой стерильности. К числу таковых принадлежат цитостатические препараты, используемые для лечения злокачественных и ревматологических патологий. В связи с возрастанием случаев благоприятного исхода заболеваний, сохранение фертильности после применения этой группы лекарственных средств является актуальным. Известно, что к числу основных механизмов действия цитостатических препаратов относится инициация окислительного стресса, который, как известно, может приводить к блоку деления клеток, в том числе и стволовых. В связи с этим, нормализация про-/антиоксидантного баланса в тестикулярной ткани может привести к восстановлению активности источников пролиферативного пула сперматогенеза.

**ЦЕЛЬ.** Изучить влияние антиоксидантного воздействия на морфологическое и функциональное состояние сперматогенеза крыс и про-/антиоксидантный статус мужских половых клеток после введения цитостатического препарата, повреждающего стволовые сперматогонии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проведены на 60 аутбредных крысах-самцах. В качестве модели цитостатического воздействия использовали паклитаксел. В качестве модели антиоксидантного воздействия был выбран полифенольный синтетический препарат пара-тирозол. Состояние сперматогенеза и репаративной регенерации семенников оценивали через 3 мес. после начала эксперимента по показателям количества сперматогоний, клеток микроокружения, общего количества половых клеток (ОКС). Про-/антиоксидантный баланс определяли методом хемилюминесценции.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Введение паклитаксела приводило к снижению (на 30%), судя по ОКС, продуктивности сперматогенеза. Количество источников пролиферативного пула сократилось на 40%, а клеток микроокружения – на 62,2% по сравнению с фоновыми показателями. Про-/антиоксидантный баланс сперматогенной ткани уменьшался в 6 раз.

На фоне сочетанного введения паклитаксела и пара-тирозола продуктивность сперматогенеза достигала фоновых значений, численность сперматогоний возрастала на 23%, клеток микроокружения – на 71,4% по сравнению с таковыми в группе контрольных животных. Про-/антиоксидантный баланс

достоверно возрастал по сравнению с контролем (паклитаксел) и практически достигал фоновых значений.

Антиоксидантный препарат пара-тирозол является эффективным средством для восстановления регенераторных возможностей сперматогенной ткани, при тестикулярной недостаточности, обусловленной повреждением источников пролиферативного пула сперматогенеза

**Машкова М.А., Горанов В.А., Мохорт Т.В.,  
Сыманович О.Ю., Хватова Л.А., Шишко Е.И.**

*Белорусский государственный медицинский  
университет*  
maruska.cool@yandex.ru

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЖНЫХ  
ЭКВИВАЛЕНТОВ IN VITRO ДЛЯ ОЦЕНКИ  
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ  
ПЕРСИСТЕНЦИИ ЯЗВ ПРИ СИНДРОМЕ  
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

**ЦЕЛЬ.** На основании изучения взаимосвязи экспрессии цитокинов у пациентов с сахарным диабетом (СД) с синдромом диабетической стопы (СДС) со скоростью заживления язвенного дефекта и степенью компенсации СД оценить возможность использования клеточной культуры кератиноцитов in vitro в изучении механизмов персистенции язвенных дефектов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 26 пациентов с СДС разделены на группы с быстрой и медленной динамикой заживления трофических язв — группы 1 (Гр1) и 2 (Гр2), соответственно. Группа контроля — 13 пациентов с СД без СДС. У пациентов определялись уровни цитокинов (ИЛ6, 8, 1, 4) в сыворотке крови и отделяемом из язв (Гр1 и Гр2), проводилось фенотипирование лимфоцитов, выделенных из периферической крови.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Уровни цитокинов в сыворотке крови составили: группа контроля — ИЛ6  $9,3 \pm 0,05$  пг/мл, ИЛ1  $34,9 \pm 1,3$ ; ИЛ4  $8,2 \pm 0,15$ ; ИЛ8  $9,6 \pm 1,6$ ; Гр1 — ИЛ6  $14,73 \pm 0,08$ ; ИЛ1  $92,3 \pm 2,2$ ; ИЛ4  $5,4 \pm 0,10$ ; ИЛ8  $8,04 \pm 0,32$ ; Гр2 — ИЛ6  $17,92 \pm 0,65$ ; ИЛ1  $97,4 \pm 2,8$ ; ИЛ4  $7,6 \pm 1,2$ ; ИЛ8  $11,3 \pm 2,5$ ; в отделяемом из язв: Гр1 — ИЛ6  $8,11 \pm 0,49$ ; ИЛ1  $12,73 \pm 1,4$ ; ИЛ4  $8,83 \pm 1,8$ ; ИЛ8  $37,41 \pm 2,19$ ; Гр2 — ИЛ6  $9,74 \pm 0,21$ ; ИЛ1  $18,01 \pm 1,0$ ; ИЛ4  $2,73 \pm 0,12$ ; ИЛ8  $34,0 \pm 0,51$ . Содержание ИЛ6 и ИЛ1 в сыворотке крови в Гр1 и Гр2 были достоверно выше, а ИЛ4 в Гр1 достоверно ниже по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Уровень ИЛ8 в экссудате раневого отделяемого у пациентов Гр1 практически в 5 раз превышал значения, выявленные в сыворотке крови —  $37,41 \pm 2,19$  против  $8,04 \pm 0,32$  ( $p < 0,05$ ). Уровень ИЛ4 в экссудате раневого отделяемого у пациентов Гр2 составил  $2,73 \pm 0,12$ , что в 3 раза ниже, чем в Гр1 ( $p < 0,05$ ). Анализ коррелятивных связей выявил положительную корреляцию между уровнем HbA1c и ИЛ1 ( $r = 0,64201$ ;  $p < 0,01$ ) и ИЛ6 ( $r = 0,52411$ ;  $p < 0,05$ ) в сыворотке крови всех исследуемых пациентов и уровнем ИЛ8 из отделяемого трофических язв ( $r = 0,73145$ ;  $p < 0,05$ ). Затяжное течение язвенного процесса сопровождалось снижением уровня ИЛ4 в отделяемом из язв ( $r = -0,62018$ ,  $n = 9$ ;  $p < 0,05$ ) и снижением экспрессии CD95 маркера лимфоцитов, выделенных из периферической крови ( $r = -0,50412$ ,  $n = 9$ ;  $p < 0,05$ ). В предварительных экспериментах с использованием клеточной монослойной культуры

перевиваемой линии человеческих кератиноцитов, были выявлены цитотоксические эффекты (по данным количественного CFDA-теста), обусловленные сывороткой крови пациентов с СДС, у которых были повышены уровни ИЛ1 и ИЛ6 цитокинов. При этом в контрольной группе с использованием сыворотки здоровых доноров с добавлением 100UE указанных цитокинов (ИЛ1 и ИЛ6) отмечено достоверное увеличение гибели клеток — менее выраженное, чем при использовании аналогичной концентрации соответствующих цитокинов в присутствии сыворотки крови пациентов с СД.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Вышеизложенное указывает на перспективность использования клеточных культур in vitro для изучения и оценки патогенетических эффектов, обусловленных иммунными маркерами, присутствующими в плазме крови пациентов с СДС.

**Мелешина А.В.<sup>1</sup>, Быстрова А.С.<sup>1,2</sup>,  
Дуденкова В.В.<sup>1,2</sup>, Клементьева Н.В.<sup>1</sup>,  
Кулагин Ф.А.<sup>1,2</sup>, Загайнова Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
almele@yandex.ru

**АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ  
ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВОК  
КЛЕТОК ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ МЕТОДОВ  
ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ  
И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

Дифференцировка стволовых клеток, как известно, сопровождается серьезной реструктуризацией. Среди основных функциональных изменений клетки — метаболическая активность, внутриклеточный pH, вязкость цитоплазматической мембраны, среди структурных — цитоскелет. Так, эффективный контроль дифференцировки стволовых клеток является большой проблемой из-за сложных взаимосвязей между различными сигнальными путями, внеклеточным микроокружением и метаболическими требованиями клетки. Только комплексный анализ позволяет решить эту проблему. Такие методы как FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy) и флуоресцентная микроскопия в сочетании с экзогенными и эндогенными маркерами позволяют неинвазивно и в течение длительного времени изучать структурно-функциональные изменения, лежащие в основе клеточного метаболизма, pH, вязкости, цитоскелета. В данной работе был проведен комплексный анализ структурно-функциональных изменений в мезенхимных стволовых клетках человека (МСК), подвергавшихся хондрогенной дифференцировке. Клеточный метаболизм исследовали на основе эндогенной флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Redoxratio ФАД/НАД(Ф)Н и времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД были прослежены с использованием флуоресцентной микроскопии в сочетании с FLIM. Уровень внутриклеточного pH в МСК был проанализирован с использованием временной трансфекции клеток pH-сенсором SypHer-2 и флуоресцентной микроскопии; вязкость плазматической мембраны — с использованием окрашивания клеток молекулярным ротором BODIPY 2 и FLIM метода; цитоскелет — с использованием временной трансфекции клеток TagRFP и STORM. В процессе

дифференцировки redoxratio снижалось и на 21 день было ниже, чем в недифференцированных клетках ( $0,65 \pm 0,11$  против  $0,77 \pm 0,13$  у.е.). Также к 21 дню наблюдалось статистически значимое снижение времен жизни связанной формы НАД(Ф)Н в хондрогенно дифференцирующихся клетках (от  $24 \pm 3,6\%$  к  $18,3 \pm 3,8\%$ ), что, вероятно, связано с преобладанием гликолиза как метаболического пути. В хондрогенно дифференцированных клетках было обнаружено и снижение значений рН по сравнению с недифференцированными клетками ( $7,4 \pm 0,13$  против  $7,6 \pm 0,09$  у.е.). Мы предполагаем, что сдвиг значений связан с подкислением внутриклеточного рН аскорбиновой кислотой, необходимой для синтеза коллагена. Анализ времени жизни флуоресценции BODIPY2 показал увеличение вязкости мембраны в хондрогенно дифференцированных клетках на 21 день дифференцировки (с  $301,47 \pm 7,06$  сПз до  $358,47 \pm 14,26$  сПз), что может быть связано с накоплением холестерина в мембране. При изучении ультраструктуры цитоскелета в хондрогенно дифференцированных клетках выявлено изменение ориентации актиновых волокон и увеличение их концевых частей при сравнении с недифференцированными клетками. Полученные результаты расширяют общие представления о функциональных изменениях в процессе дифференцировок стволовых клеток и открывают новые пути для разработки стратегий лечения в регенеративной медицине и терапии стволовыми клетками.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 14-15-00536.*

#### **Мензоров А.Г.**

*Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН  
menzorov@bionet.nsc.ru*

#### **КОЛЛЕКЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКОГО И БИМЕДИЦИНСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ**

Плюрипотентные стволовые клетки широко используются в биомедицинских и фундаментальных исследованиях. Их дифференцировка в различные типы клеток позволяет создавать модели заболеваний. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека открывает возможность пациент-специфической клеточной терапии. Так как ИПСК способны неограниченно делиться в культуре, можно корректировать генетические дефекты и затем дифференцировать в желаемый тип клеток. Также, продукты дифференцировки ИПСК — идеальная модель для тестирования различных лекарств на клетках или органоидах определенного генотипа. Много исследований проводится с использованием эмбриональных стволовых (ЭС) клеток и ИПСК мыши. Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации ЭС клеток или ИПСК дает возможность изучать действие мутаций на выровненном генетическом фоне. Помимо моделирования заболеваний плюрипотентные клетки позволяют изучать фундаментальную проблему — поддержание плюрипотентности. К настоящему времени ИПСК были получены менее чем для 20 видов животных и даже для таких хорошо изученных видов как мышь остаются нерешенные вопросы. Несмотря на общие механизмы поддержания плюрипотентно-

сти каждый вид имеет свои особенности. Например, мы недавно получили ИПСК американской норки, имеющие низкий уровень экспрессии гена Nanog, ключевого маркера плюрипотентности, при этом способные дифференцироваться в клеточные производные всех трех зародышевых листков. Таким образом, цель Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления (Коллекция) ФИЦ ИЦиГ СОРАН — обеспечить российскими исследователями уникальными плюрипотентными стволовыми клетками для исследовательских проектов широкой тематики. Нами были получены и депонированы в Коллекцию 62 уникальные линии клеток: ЭС клетки мыши, в том числе генетически модифицированные — 36, гибридные клетки мыши — 6, ЭС клетки американской норки — 7, ИПСК американской норки — 11, ИПСК человека — 2. Клетки трех линий ЭС клеток мыши участвовали в формировании зародышевого пути: химерные животные, полученные инъекцией ЭС клеток в бластоцисту, дали потомков со вкладом генотипа ЭС клеток. Эти линии готовы для проведения комплексной модификации генома с последующим получением трансгенных мышей. Плюрипотентные клетки американской норки — уникальная возможность изучать плюрипотентность Хищных. ИПСК человека могут использоваться как контрольные линии для, например, изучения дифференцировки ИПСК в нейроны *in vitro*. Сайт Коллекции доступен в сети Интернет по адресам <http://ckp.icgen.ru/cells/> и <http://cells.biores.cytogen.ru/cells/>.

Финансирование исследования: *Бюджетный проект «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления».*

#### **Меньшиков М.Ю., Стафеев Ю.С.**

*ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
myumensh@mail.ru*

#### **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТАТУСА МАКРОФАГОВ И ИХ ПАРАКРИННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АДИПОЦИТОВ К ИНСУЛИНУ**

Способность макрофагов к формированию провоспалительного (M1) или противовоспалительного (M2) фенотипа характеризует их фенотипическую пластичность и является условием нормального развития воспаления. Нарушение этого механизма приводит к латентному воспалению, — одной из причин атеросклероза, метаболического синдрома и диабета 2-го типа. Коррекция этих нарушений может быть связана с применением средств, воздействующих на воспалительный клеточный сигналинг. В настоящей работе изучено влияние противовоспалительных агентов, — активаторов НАД-зависимых деацетилаз (сиртуинов) и лиганда ядерных рецепторов PPAR $\gamma$  на поляризацию макрофагов и их способность регулировать инсулиновую чувствительность адипоцитов. В качестве клеточной модели использовали макрофаги линии RAW264.7, поляризованные по M1-типу в присутствии бактериального липополисахарида и интерферона- $\gamma$ , и по M2-типу в присутствии интерлейкина-4. Макрофаги M1 имели повышенную экспрессию TNF $\alpha$ , CXCR9 и CCR7 и секрецию цитокина

CXCL11, а также генерировали активные формы кислорода, с преобладанием фенотипа, имеющего дендритоподобную форму. В макрофагах M2 выявлена достоверно более высокая, чем в M1, экспрессия факторов IGF1, ALOX15, а также маннозного рецептора CD206. Активаторы сиртуинов ресвератрол и DCHC (3-(2,4-дихлорофенил)-7-гидрокси-4-хромен-4-он) и активатор PPAR $\gamma$  розиглитазон вызывали снижение экспрессии воспалительных маркеров TNF $\alpha$ , CXCL9 и повышали экспрессию IGF1 и ALOX15. Ингибиторы SIRT1 сиртуинов и Ex527 не оказывали достоверных эффектов на экспрессию маркеров в M1 и M2 макрофагах. Ингибитор SIRT1, соединение Ex527 (6-хлоро-2,3,4,9-тетрагидро-1Н-карбазол-1-карбоксамид) повышало долю дендритоподобных клеток в M0, M1 и M2-популяциях макрофагов. Кратковременное воздействие инсулина на адипоциты, полученные из мышечных фибробластов 3T3L1 по методу Zebisch et.al. 2012, вызывало усиление фосфорилирования киназы Akt по Thr308 и Ser473. Кондиционированная среда M1-клеток вызывала снижение уровня pAktThr308 и повышала уровень pAktSer473 в 3T3L1 адипоцитах. Эти эффекты не выявлялись в присутствии кондиционированных сред M2-макрофагов, а также макрофагов M1, культивированных в присутствии активатора SIRT1, DCHC, и розиглитазона. Напротив, кондиционированная среда M2 макрофагов, а также среда M1 макрофагов, обработанных DCHC, индуцировала повышение уровня фосфорилирования сайта AktThr308 и снижала уровень pAktSer473. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование SIRT1 и рецепторов PPAR в качестве терапевтических мишеней для оптимизации регенеративных процессов и смягчения процессов латентного воспаления представляет интерес в сочетании с изучением внутриклеточных сигнальных процессов.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ № 15-04-07840.*

**Мионов А.В.<sup>1</sup>, Бозо И.Я.<sup>2</sup>, Деев Р.В.<sup>2</sup>, Комлев В.С.<sup>3</sup>, Миронова О.А.<sup>1</sup>, Попов В.К.<sup>1</sup>, Смирнов И.В.<sup>3</sup>, Федотов А.Ю.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Институт фотонных технологий РАН, ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН,*

<sup>2</sup> *Институт стволовых клеток человека*

<sup>3</sup> *Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН scftlab@gmail.com*

### **АДДИТИВНОЕ ПРОИЗВОДСТВО МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Основной целью применения аддитивных технологий в области регенеративной медицины, является создание тканеинженерных конструкций, содержащих помимо искусственного каркаса живые клетки. В силу определенных требований, предъявляемых к материалам, контактирующим с живой тканью, их выбор не слишком широк и сводится в основном к ряду синтетических и натуральных полимеров, и кальций фосфатным соединениям. В докладе представлены результаты работы по созданию искусственных имплантируемых клеточных матрикс, с применением трёх различных методов трёхмерной печати: из расплава, из растворов и струйной печати порошковых материалов. Для экспериментальной работы авторским коллективом были разработаны и созданы специализированные установки. Соот-

ветствие методов трёхмерной печати поставленным задачам было показано на модельных соединениях и композициях: триблоксополимере поликапролактона с полиэтиленгликолем для печати из расплава; мелкодисперсными фракциями трикальцийфосфата для струйной печати; водоотверждаемых растворах полиэфиров в тетрагликоле и композициях на основе альгината для печати из растворов.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 16-29-11722 офи\_м) и Российского Научного Фонда (грант № 15-13-00108).*

**Бурнышева К.М.<sup>1</sup>, Абрамов А.А.<sup>2</sup>, Кечко О.И.<sup>1</sup>, Полуэтов Ю.М.<sup>1</sup>, Петрушанко И.Ю.<sup>1</sup>, Митькевич В.А.<sup>1</sup>, Лакомкин В.Л.<sup>2</sup>, Макаров А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН*

<sup>2</sup> *Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России mitkevich@gmail.com*

### **НОРМАЛИЗАЦИЯ УРОВНЯ РНК В КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА С ПОМОЩЬЮ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ**

При ишемии/реперфузии происходит выброс РНК из поврежденных клеток миокарда в кровеносное русло. Такие внеклеточные РНК (внРНК) индуцируют выброс целого ряда провоспалительных цитокинов, что приводит к миграции лейкоцитов в зону поражения, развитию отека тканей в результате увеличения проницаемости сосудов и тромбообразованию, поскольку РНК выступает в роли прокоагулянта. Показано, что использование рибонуклеаз млекопитающих семейства РНКазы А, разрушающих внРНК, ускоряет в животных восстановление функции сердца и снижает воспаление ткани миокарда и сосудов после операций на сердце и инфаркта миокарда. Мы предположили, что РНКазы биназа из *Bacillus pumilis* будет эффективным инструментом для восстановления функции сердца. Мы показали, что в отличие от РНКазы А и ее гомологов биназа не ингибируется ингибитором РНКаз млекопитающих и ее активность не меняется в присутствии восстановительных агентов. Это показывает, что биназа не чувствительна к изменению редокс условий, по-видимому, из-за отсутствия остатков цистеина и метионина, что показывает ее перспективность для сочетанной терапии с восстановительными агентами при ишемии/реперфузии. Внутривентрикулярное введение биназы мышам в дозе до 5 мг/кг не вызывает выраженного иммунного ответа и токсического действия. В качестве модели повреждения миокарда для исследования кардиопротекторного действия биназы использовалось двукратное введение синтетического катехоламина-изопротеренола бодрствующим крысам. В этой модели часть кардиомиоцитов гибнет и в течение 3–4-х нед. замещается соединительной тканью, что характерно для хронической ишемии миокарда. Было определено изменение уровня РНК в крови животных на протяжении 7 дней после первого введения катехоламина-изопротеренола. Биназу начинали применять одновременно со вторым введением катехоламина-изопротеренола, которое вызы-

вает развитие повреждения ткани миокарда. Биназу вводили животным каждые 24 ч. в концентрации 50 мкг/кг. Уровень биназы в крови животных оценивали по ее специфической РНКазной активности. Применение биназы достоверно снижало уровень РНК в крови животных с повреждением миокарда, что должно способствовать повышению его регенеративного потенциала. В дальнейшем, для доказательства протекторного действия биназы, будет оценено ее влияние на размер зоны повреждения миокарда, уровень противовоспалительных цитокинов и различных биомаркеров инфаркта миокарда в крови животных. Препарат на основе биназы, в случае доказательства его эффективности для восстановления функции сердца, может быть использован для предотвращения развития патологических процессов и осложнений во время операций на сердце, сопровождающихся ишемией/реперфузией, что приводит к значительным повреждениям кардиомиоцитов, а также при инфаркте миокарда и кардиоваскулярных тромбообразованиях.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 17-34-80086 (Эврика!Идея).*

**Михайлов В.М., Соколова А.В., Каминская Е.В.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
vmikhailov@incras.ru

#### **ЗАМЕНА КОСТНОГО МОЗГА КАК СПОСОБ ТЕРАПИИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

В настоящее время накапливаются данные, что помощь больным моногенными заболеваниями, такими как миопатия Дюшенна, серповидная клеточная анемия или дисферлиновая миопатия, может быть достигнута при трансплантации реципиентам клеточных популяций дикого типа, содержащих стволовые клетки (СК), способные к самообновлению из-за использования асимметричного митоза. Среди тканей организма мезодермального происхождения самообновляющимися популяциями СК являются стволовые клетки костного мозга (СККМ), миобласты поперечно-полосатых мышц (МПМ) и половые клетки. Для приживания трансплантированных СККМ в костном мозге реципиентов необходимо освободиться от собственных СККМ, что достигается при помощи рентгеновского облучения (РО) реципиентов. Трансплантация СККМ после миелоаблативного РО в дозе 5 Гр и выше небезопасна, так как способна вызвать у реципиентов реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) и ряд осложнений вплоть до гибели организмов. Трансплантация СККМ после немиелоаблативного РО в дозах 2–3 Гр избавляет реципиентов от РТПХ и превращает их в иммунологические химеры. У химер-людей больных серповидноклеточной анемией выживаемость реципиентов после замены костного мозга достигает 80–90% (Vermylen, 2013). У взрослых больных излечение возможно только после немиелоаблативной трансплантации СККМ. На мышцах mdx мы использовали дозу РО 3Гр (Соколова, и др., 2010, 2016). В течение годового эксперимента иммуноморфологически было установлено, что у химер mdx синтез дистрофина возрастает от  $1.1 \pm 0.4\%$  поперечно-полосатых мышечных волокон (ППМВ) до  $28.7 \pm 7\%$  ППМВ на 6 мес. после трансплантации СККМ. К 12 мес. доля дистрофин(+) ППМВ уменьшается до  $5 \pm 0.1\%$ . Ди-

намика синтеза дистрофина в ППМВ диафрагмы аналогична, что подтверждает общий терапевтический эффект замены мутантных СККМ на СККМ дикого типа. Для оценки эффективности усиления синтеза дистрофина мы использовали анализ структуры синапсов. На 4-ом месяце после РО у реципиентов восстанавливается структура синапсов. При этом величина среднего местного электрического потенциала покоя возрастает до уровня мышц контрольных животных (Кравцова и др., 2011). Результаты впервые указывают на возможность восстановления синтеза дистрофина у мутантных мышечных mdx после немиелоаблативной замены мутантных СККМ на СККМ костного мозга дикого типа. Представляет интерес углубление полученных результатов на модели миодистрофии у собак, наиболее сходной с болезнью Дюшенна у человека.

Финансирование исследования: *гранты РФФИ, Грант РФФИ № 14-50-00068.*

**Гайдаш А.А.<sup>1</sup>, Чекан Н.М.<sup>2</sup>, Крутько В.К.<sup>3</sup>, Сердобинцев М.С.<sup>4</sup>, Михайлова Н.А.<sup>1</sup>, Блинова М.И.<sup>1</sup>, Мусская О.Н.<sup>3</sup>, Александрова С.А.<sup>1</sup>, Копелев П.Н.<sup>1</sup>, Казбанов В.В.<sup>4</sup>, Скроцкая К.В.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> ГНУ «Физико-технический институт НАН Беларуси»

<sup>3</sup> ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»

<sup>4</sup> ФГБУ Санкт-Петербургский

НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России

<sup>5</sup> Белорусский государственный университет, Институт физико-химических проблем, Минск, Беларусь  
natmik@mail.ru

#### **ОСТЕОГЕНЕЗ НА ТИТАНОВЫХ НАНОТРУБКАХ, ДОПИРОВАННЫХ АМОРФИЗИРОВАННЫМ ГИДРОКСИАПАТИТОМ В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

Одним из модуляторов остеогенеза являются аморфизированные кальций фосфаты, состав и структура которых сходны с биоапатитом. Цель исследования — изучить цитосовместимость и особенности остеогенеза на титановых матрицах с нанотрубками, допированными аморфизированным гидроксипапатитом. Мезенхимные стволовые клетки костного мозга новорожденного кролика культивировали 14 сут. в ростовой и дифференцировочной средах с добавлением коллагена I типа в условиях *in vitro* на титановых матрицах (ТТ), электрохимически покрытых нанотрубками (TiO<sub>2</sub>) и допированных методом иммерсионного наполнения аморфизированным карбонатгидроксипапатитом [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>]. По данным сканирующей электронной микроскопии нанотрубки представлены полыми структурами диаметром до 50 нм, в которых выявляются частицы кальций фосфатов, в виде ветвящихся нанокристаллитов. Основная часть клеток проявляет морфологические признаки жизнеспособности и дифференцировки в остеогенном направлении. Характерными органотипическими структурами являются костные пластинки и трабекулоподобные образования. Пластинки представляют собой компактизированные коллагеновые фибриллы, склеенные в плоские ламеллы, которые расположены на верхнебоковых поверхностях клеток, имеют отверстия в центре и окружены матричными пузырьками. Морфологиче-

ские особенности пластинчатых структур идентичны таковым костных пластинок, формирующихся на поверхностях остеобластов в зоне регенерации костной ткани в условиях *in vivo*. Неорганическая фаза матриксных пузырьков состоит из кальций фосфатов в соотношении Са/Р 2.5:1. Диаметр пузырьков внутри клеток колеблется в пределах 1–3 мкм и в цитоплазме они направленно мигрируют в сторону формирующихся костных пластинок, местами выстраиваясь в цепочечные структуры. За пределами клеток пузырьки сливаются с образованием сфероидов диаметром до 6–8 мкм. Трабекулоподобные структуры – это плотные вытянутые костные пластинки, отделившиеся от клеток и склонные к сцеплению на концах с формированием сетевидных комплексов. Таким образом, показано, что оксид титановые нанотубулярные покрытия, допированные аморфизированным карбонатгидроксиапатитом, обладают остеоиндуктивными свойствами.

Финансирование исследования: *Грант РНФ № 14-50-00068 «Стволовые клетки – основа клеточных технологий» (рук. акад. Н.Н. Никольский)*

### **Миханов В.А., Шурыгина Е.И.**

*Оренбургский государственный медицинский университет  
vmikhanov@gmail.com*

#### **МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ТИРЕОИДНО-ПАРАТИРЕОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ПЕРЕЛОМАХ**

Изучение механизмов и регуляции посттравматической регенерации костной ткани имеет важное фундаментальное значение для решения ряда проблем практической медицины. Важную роль в регуляции костного метаболизма играют С-клетки щитовидных желез (ЩЖ) и паратиреоциты околощитовидных желез (ОЩЖ). Динамика структурных изменений данных регуляторов репаративного остеогенеза в настоящее время изучена недостаточно. Цель исследования – определение структурных изменений в ЩЖ и ОЩЖ в процессе репаративного остеогенеза. Исследование проведено на 35 половозрелых самцах крыс линии «Вистар», которым выполнена остеотомия средней трети диафиза большеберцовой кости с естественной иммобилизацией посредством сохранившей целостность малоберцовой кости. Исследовали зону регенерирующей костной ткани, ЩЖ и ОЩЖ с применением гистологического метода и иммуногистохимического исследования. Функциональную активность главных эндокриноцитов ОЩЖ определяли на основании соотношения темных и светлых форм, подсчет которых, а также клеток в зоне перелома произвели в 10 полях зрения на условной единице площади 2,5×2,5 с использованием точечной сетки – вставки при увеличении ×400. При оценке экспрессии Ki-67 рассчитывали индекс пролиферации (ИП) по формуле:  $ИП = (n+ / N) \times 100\%$ , где  $n+$  – число меченых ядер,  $N$  – общее число ядер. Относительную объемную плотность (ООП) иммуногистохимически определяемых белков рассчитывали по формуле:  $ООП (\%) = (Sa / St) \times 100$ , где  $Sa$  – суммарная площадь всех областей в анализируемом изображении, содержащих исследуемый белок;  $St$  – общая площадь цифровой микрофотографии. С 1-х сут. гистогенеза темные паратиреоциты преобладают в популяции ( $65,9 \pm 3,15\%$ ). Подобная

функциональная трансформация паратиреоцитов, связанная с активным синтезом паратгормона, наблюдается до 14 сут. включительно ( $78,5 \pm 4,08\%$ ) С 21 сут. содержание темных паратиреоцитов уменьшается до 24.1% и постепенно к 61-м сут. достигает контрольных величин ( $18,8 \pm 1,05\%$ ). О повышенной активности ОЩЖ на ранних этапах репарации костной ткани можно судить по увеличению ИП паратиреоцитов. Проллиферативная активность увеличивается до  $18,24 \pm 0,75\%$  к 7-м сут., а затем снижается в 3 раза к 14-м, и далее постепенно достигает контрольных значений к 61-м сут.  $2,2 \pm 0,07\%$ . Начиная с 14-х сут. выявляются морфологические признаки функциональной активности С-клеток: увеличивается число кальцитониноцитов, с достижением максимальных значений на 21 сут. ( $9,12 \pm 0,24$ ), что коррелирует с активным костеобразованием в зоне перелома с преобладанием остеобластов ( $43,13 \pm 1,21$ ) и возрастанием (в 4 раза по сравнению с первыми сутками) относительной объемной плотности остеокальцина ( $0,841 \pm 0,102\%$ ). После наблюдаем постепенное снижение кальцитониноцитов к 61-м сут. до  $4,68 \pm 0,13$ . Таким образом, в процессе репаративного остеогенеза ЩЖ и ОЩЖ подвергаются значительным морфофункциональным изменениям, обеспечивающим динамику процессов резорбции кости и остеорепаляции, результатом чего является органотипическое восстановление костной ткани.

Финансирование исследования: *Оренбургский государственный медицинский университет.*

### **Миханов В.А., Полякова В.С.**

*Оренбургский государственный медицинский университет  
vmikhanov@gmail.com*

#### **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Переломы костей провоцируют развитие как местных, так и общих компенсаторно-приспособительных реакций, оказывающих регуляторное воздействие на регенерацию ткани. Считается, что именно гипоталамо-гипофизарная система и ее конечные продукты – гормоны представляют собой конечный общий путь в формировании таких реакций. Цель работы – изучение динамики структурно-функциональных изменений нейрогипофиза в ходе репаративной регенерации длинных трубчатых костей. Экспериментальное исследование проведено на 35 половозрелых крысах самцах линии «Вистар», которым костными кусочками формировали поперечный перелом средней трети диафиза большеберцовой кости с последующим сшиванием кожной раны одноузловым швом. Материал для исследования – зона перелома кости, гипофиз. Для изучения структуры нейрогипофиза (НГ) на светооптическом уровне была использована методика окраски на нейросекрет (НС) по Баргману. В НГ подсчитывали процентное содержание НС в условно нами выделенных четырех группах нейросекреторных телец (НТ): I – мелкие, площадь (S) = 0,1–0,5 мкм<sup>2</sup>; II – средние, S = 0,5–4,0 мкм<sup>2</sup>; III – крупные, S = 4,0–50,0 мкм<sup>2</sup> и IV – гигантские, S более 50,0 мкм<sup>2</sup>. Подсчет относительной объемной плотности (ООП) НТ производился в относительных значениях, как отношение их площади к общей пло-

щадя тканевых элементов в пределах исследуемого гистосреза. На первые сутки после перелома происходит «экстренная мобилизация» резервов гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы, проявляющаяся усилением экстружии НС из НТ в просвет капилляров НГ, что проявляется снижением относительной объемной плотности НТ с  $17,41 \pm 1,2$  до  $14,8 \pm 1,1\%$  и в большей мере средней S НТ с  $4,89 \pm 0,23$  до  $1,77 \pm 0,11$  мкм<sup>2</sup>, за счёт уменьшения в первую очередь ООП гигантских НТ с  $9,45 \pm 0,64$  до  $2,1 \pm 0,17$  мкм<sup>2</sup>, при этом ООП мелких и средних НТ увеличивается с  $1,93 \pm 0,15$  до  $5,2 \pm 0,3$  мкм<sup>2</sup> (в них трансформируются более крупные НТ), что и компенсирует значительное снижение ООП НТ. 3 сут. эксперимента сопровождаются «истощением» структурно-функциональных резервов НГ и проявляются максимальной депрессией ООП НТ до  $0,99 \pm 0,05\%$  и средней S НТ до  $0,74 \pm 0,03$  мкм<sup>2</sup>, при этом полностью исчезают гигантские НТ. Тогда как на 7 сут. в НГ наблюдается значительное увеличение показателей ООП  $8,84 \pm 0,47\%$  и средней S НТ до  $2,14 \pm 0,16$  мкм<sup>2</sup>. На 28 сут. в НГ после предыдущей депрессии начинается рост показателей ООП и средней S НТ, а на 61 сут. эксперимента происходит восстановление и стабилизация структур НГ с максимальным приближением к показателям контроля, что по сроку совпадает с завершающим этапом консолидации перелома кости. Таким образом, структурные изменения НТ в ходе репаративной регенерации кости объективно отражают изменения функциональной активности НГ в целом. В контроле гигантские (>50,0 мкм<sup>2</sup>) НТ составляют большую ООП в НГ по сравнению с НТ других размеров, а в период репаративной регенерации уменьшаются в первую очередь и восстанавливаются лишь к концу остеорепарации, что дает основание предполагать о их роли в НГ как депо НС.

Финансирование исследования: *Оренбургский государственный медицинский университет.*

**Мишина Е.С.<sup>1</sup>, Омеляненко Н.П.<sup>2</sup>,  
Волков А.В.<sup>2</sup>, Ширшин Е.А.<sup>3</sup>, Родионов С.А.<sup>2</sup>,  
Ковалев А.В.<sup>2</sup>, Сморгчов М.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова» Минздрава России

<sup>3</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова  
katusha100390@list.ru

### **МНОГОУРОВНЕВЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ КОЖИ КРЫСЫ В НОРМЕ**

Кожная рана крысы является одной из самых распространенных моделей при исследовании регенераторного процесса и изучении его в разных условиях, влияния различных факторов и новых препаратов. Однако, в настоящее время нет исчерпывающих данных о нормальном строении кожи на различных уровнях ее организации. Целью исследования стало изучение кожи крысы на микро-, ультрамикро- и наномикроскопическом уровнях в норме. Материалом исследования служили фрагменты кожи крысы с латеральной части туловища. Полученный материал изучали с использованием светооптической, электронной, мультифотонной конфокальной микро-

скопии. В коже интактных белых крыс эпидермис представлен базальным слоем мелких эпителиоцитов, 2–3 ряда шиповатых эпителиоцитов, зернистыми клетками и роговыми эпителиоцитами. Дерма занимает основную часть кожи и ее глубокий слой дермы, не прерываясь, переходит в рыхлую неоформленную соединительную ткань подкожно-жировой клетчатки. При этом толщина всех слоев меняется в разных топографических областях. В дерме выделяют 2 слоя: поверхностный сосочковый и более глубокий сетчатый. Волокнистая часть дермы представляет собой коллагеново-эластический, волоконно-фибриллярный неориентированный волокнистый остов. Коллагеновые волокна дермы спирализованы. При этом они могут быть цилиндрическими, уплощенными, округлой формы, на поперечных срезах составляя волоконный уровень организации. Фибриллярный уровень представлен коллагеновыми фибриллами, входящими в состав волокон. Они также имеют округлую форму на поперечных срезах, встречаются фибриллы с разными диаметрами. Фибриллы могут существовать самостоятельно или объединяться в волокна. Характерным признаком коллагеновых структур, как волокон, так и фибрилл является ветвление волокнистых элементов или их интеграция, т.е. происходит перераспределение волокнистых структур в составе остова. Фибриллы могут делиться на две и более ветвей в одном месте сразу или по протяжению фибриллы. Далее тонкие фибриллы или ветви могут сливаться, образуя более крупные фибриллярные структуры. Эластические волокна цилиндрической формы. Они ветвятся. В сетчатом слое большая часть волокон располагается параллельно поверхности кожи. Другая часть – перпендикулярна поверхности. Эти волокна соединяют параллельно идущие волокна. В сетчатом слое в основном присутствуют собственно эластические волокна. В сосочковом слое эластические волокна значительно тоньше. Из сетчатого слоя эластические волокна следуют в подкожно-жировую клетчатку. Сложную трехмерную конструкцию, образующуюся в результате взаимодействия вышеперечисленных структур дермы, позволяют подтвердить данные, полученные при исследовании на мультифотонном микроскопе у живых крыс. Таким образом, получение данных о нормальном строении составляет фундаментальные знания для сопоставления полученных результатов экспериментов, проведения клинических исследований и возможности экстраполяции их в медицинскую практику.

**Омельяненко Н.П.<sup>1</sup>, Мишина Е.С.<sup>2</sup>,  
Волков А.В.<sup>1</sup>, Ковалев А.В.<sup>1</sup>, Сморчков М.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России  
katusha100390@list.ru

**СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ВОЛОКНИСТОЙ ОСНОВЫ РЕПАРАТИВНОГО РЕГЕНЕРАТА ОТ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО ДО ТКАНЕВОГО УРОВНЯ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИ СПОНТАННОМ ЗАЖИВЛЕНИИ ОГРАНИЧЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ**

Основой заживления поврежденного органа является соединительнотканый регенерат, большую часть которого составляют волокнистые элементы. Возможность управления процессом репаративной регенерации связана с пониманием механизмов спонтанного фиброгенеза, имеющего многоэтапный характер. Известные данные по этому процессу ограничиваются отрывочными сведениями. Актуальным вопросом остается интеграция регенерата с сохраненной окружающей тканью. В связи с этим целью исследования явилось изучение механизмов фиброгенеза в репаративных регенератах при спонтанном заживлении кожных ран. В качестве модели исследования были выбраны кожные раны, создаваемые у белых крыс-самцов линии Wistar. Исследовали кожу, включающую зону раневого дефекта, формирующийся на его месте регенерат и окружающую его кожу. Образцы были взяты спустя 3, 7, 14, 21 и 30 дней. Полученный материал изучали с использованием светооптической и электронной микроскопии. Началом фиброгенеза являлась миграция и пролиферация предшественников фибробластов в зону повреждения на этапе завершения воспаления. В межклеточном пространстве появлялись мелкие (около 10 нм) электронноплотные гранулы, рассеянные по всему внеклеточному матриксу. Вероятно последние являлись супрамолекулярными коллагеновыми агрегатами, т. к. часть из них, взаимодействуя друг с другом, образовывала коллагеновые фибриллы. Их диаметр варьировал от 20 до 70 нм. Этот процесс имел полилокальный характер. Участки их организованного расположения перед формированием коллагеновых фибрилл, и фибриллы с рыхлым расположением гранул, в которых промежутки между гранулами превышали размеры самих гранул. При укладке гранул в фибриллу четко прослеживается поперечная исчерченность от 60 до 70 нм. При росте фибрилл в длину, зоны организованного расположения фибрилл встречаются друг с другом, уплотняются, в результате чего образуются более длинные фибриллы, а затем единая сеть. Далее часть фибрилл агрегируется в волокна. Волокна имели плоскую или уплощенную форму. Их ориентация имела в основном тангенциальную направленность по отношению к поверхности кожи. В участках дермы, граничащих с дефектом после повреждения, коллагеновые волокна дезинтегрированы на отдельные фибриллы, концы которых представляли скопления организованных электронноплотных гранул. Они соединялись с таковыми коллагеновых фибрилл регенерата. После сближения гранул формировались единые фибриллы регенерата и сохранившейся дермы. Фи-

бриллы переплетались между собой, образовывали волокна, отличающиеся по форме от волокон регенерата и сохранившейся дермы, что позволило выделить отдельный переходный слой. Таким образом, многоуровневая организация волокнистых элементов соединительной ткани соответствует этапам их агрегации в процессе репаративного фиброгенеза. Условия течения его отличаются от эмбрионального гистогенеза и последующего постнатального развития, что приводит к отличию в конструкции тканевого уровня организации волокнистых элементов репаративных регенератов.

**Мозговой С.И., Керученко М.А., Назаров А.Н., Кононов А.В.**

Омский государственный медицинский университет  
simozgovoy@yandex.ru

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ АТРОФИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ КАК РЕАЛИЗАЦИЯ СТАРТОВОЙ ПЛОЩАДКИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА**

Выявление особенностей развития атрофии слизистой оболочки, и в связи с этими особенностями персонификация прогноза атрофии и риска рака желудка явились целью исследования. Материалом исследования послужили гистобиоптаты 121 пациента с наличием H. pylori-ассоциированного хронического гастрита. Использовали следующую панель антител, включавшую маркер пролиферации Ki-67, маркер повреждения ДНК-P53, маркер апоптоза — каспазу-3, гастроинтестинальные муцины, факторы дифференцировки: кишечный — CDX-2, желудочный — Shh. В работе представлялось интересным рассмотреть вклад атрофии слизистой оболочки в формирование 3 основных вариантов хронического атрофического гастрита (атрофический антрум-гастрит, мультифокальный атрофический гастрит, атрофический пангастрит). При атрофическом антрум-гастрите доминировало абсолютное уменьшение желез. Основным вариантом метапластической атрофии при антрум-гастрите являлся вариант с полной кишечной метаплазией (полная метапластическая атрофия). При полной кишечной метаплазии имеет место смещение зоны пролиферации вниз: большинство Ki-67 позитивных клеток располагались в области тела и дна желез. При атрофическом антрум-гастрите по отношению к группе сравнения выявлено повышение пролиферативной активности желудочного эпителия. При сравнении пролиферативной активности в желудочном и метаплазированном эпителии достоверных различий выявлено не было. Таким образом, особенностью развития атрофии при антрум-гастрите является абсолютная убыль эпителия желез при инверсии топографии пролиферативного компартмента в случае метапластической атрофии. При атрофическом мультифокальном гастрите обнаружен ранее не описанный механизм атрофии, который мы назвали гиперпролиферативной метапластической атрофией: атрофия развивается не за счет абсолютной убыли желез, а в результате кишечной метаплазии эпителия. Особенностью атрофии при мультифокальном гастрите является доминирование метапластической атрофии в сочетании с высокой пролиферативной активностью метаплазированного эпителия, чем его пролиферация выше, тем больше убыль специ-



ализированных клеток, тем выраженной атрофия. Обнаруженные при атрофическом пангастрите особенности (нарастание экспрессии Shh и P53 в метаплазированном эпителии) являются свидетельством того, что это самостоятельная форма хронического гастрита. Доминирует гиперпролиферативная кишечная метаплазия. В постнатальном периоде повышенная экспрессия Shh может отражать различные ситуации, в том числе, быть ассоциирована с онкогенезом: моноклоновая пролиферация характеризующая новым продуктом транскрипции. Именно в таких биоптатах был обнаружен самый высокий индекс метки P53. Следовательно при атрофическом пангастрите метаплазия эпителия характеризуется не только новым продуктом транскрипции, но и повреждением ДНК. Таким образом, при атрофическом пангастрите формируются предпосылки развития неоплазии: новый продукт транскрипции, накопление повреждений ДНК в условиях вариабельного апоптоза и моноклоновой пролиферации.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых-докторов наук (грант № МД-692.2017.7).*

**Мойсенович А.М.<sup>1</sup>, Машков А.Е.<sup>2</sup>, Федулов А.В.<sup>2</sup>, Солдатенко А.С.<sup>1</sup>, Агапов И.И.<sup>3</sup>, Куликов А.В.<sup>4</sup>, Архипова А.Ю.<sup>1</sup>, Васильева Т.В.<sup>1</sup>, Мойсенович М.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им.

акад. В.И. Шумакова» Минздрава России

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН  
a-moisenovich@mail.ru

#### **ВИТАЛИЗИРОВАННЫЙ АЛЛОГЕННЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА СКАФФОЛД НА ОСНОВЕ ФИБРОИНОВЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТА ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ**

Одной из важнейших задач современной тканевой инженерии является разработка биомедицинских изделий – скаффолдов, которые могут служить основой для пролиферации и дифференцировки клеток, обеспечивая регенерацию утраченного или поврежденного органа или ткани. Разработка и получение таких скаффолдов является актуальной биомедицинской задачей, поскольку будет способствовать решению проблемы нехватки донорских органов при множестве широко распространенных заболеваний и травм, в том числе кожных покровов и органов желудочно-кишечного тракта. Кроме того, такие скаффолды могут быть витализированы различными клетками, в том числе мезенхимальными стромальными клетками. Важнейшим этапом создания скаффолда является выбор материала. Фиброин шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* обладает рядом уникальных свойств и активно используется для разработки биомедицинских изделий. Фиброин является биосовместимым полимером, его деградация в организме сопровождается образованием

нетоксичных, и, в некоторых случаях, полезных для регенерации продуктов. В данной работе нами были изучены регенеративные свойства имплантата, изготовленного из фиброиновых волокон, витализированного аллогенными клетками костного мозга, в модели дефекта тощей кишки крысы. Дефект был сформирован в виде овального отверстия размером 0.8×0.6 см на участке кишки, расположенном на 7 см дистальнее желудка, и закрыт фрагментом трубки из фиброиновых волокон, витализированной клетками костного мозга. В контрольной группе дефект был закрыт путем наложения анастомоза. Большая часть животных контрольной группы погибла, вследствие перитонита и кишечной непроходимости из-за спаечных процессов. В экспериментальной группе все животные выжили. Через 3 нед. после имплантации проводили гистологический анализ тканей, образовавшихся на месте повреждения. Макроскопическое и микроскопическое исследование среза стенки кишки на месте травмы через 3 нед. выявило полную биорезорбцию имплантата за исключением области, контактирующей с шовным материалом. Уже через 3 нед. после имплантации наблюдалось полное восстановление всех структурных и функциональных слоев кишечной стенки, а материал скаффолда уже не выявлялся. Строеие вновь образованной стенки кишки характерно для нормальной стенки тонкого кишечника. Выявлялись слизистая оболочка, подслизистая, 2 слоя мышц: циркулярный и продольный, и серозная оболочка. Наблюдалось восстановление иннервации стенки тощей кишки: выявлялись подслизистые и межмышечные нервные сплетения. Таким образом, имплантат на основе фиброиновых волокон обеспечивает герметичность кишечника и благоприятные механические и физиологические условия для восстановления всех структурных и функциональных элементов стенки тощей кишки.

Финансирование исследования: *Работа осуществлена при поддержке РФФИ (грант № 15-29-04903).*

**Бессонов И.И.<sup>1,2</sup>, Копицына М.Н.<sup>1</sup>, Котлярова М.С.<sup>2</sup>, Мойсенович А.М.<sup>2</sup>, Архипова А.Ю.<sup>2</sup>, Богуш В.Г.<sup>3</sup>, Багров Д.В.<sup>2</sup>, Колосов А.С.<sup>2</sup>, Шайтан К.В.<sup>2</sup>, Мойсенович М.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Акционерное общество «Перспективные медицинские технологии»

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> ГНЦ РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»  
mmoisenovich@mail.ru

#### **НОВЫЕ КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ МЕТАКРИЛИРОВАННОГО ЖЕЛАТИНА И СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ШЕЛКА**

Проблема нехватки донорских органов в перспективе может быть решена путем создания их биосовместимых аналогов. Основой таких аналогов являются конструкции из биосовместимых материалов, к которым относятся структурные белки шелка, обладающие уникальными механическими характеристиками и способностью к биорезорбции.

Данная работа посвящена изучению новых фотоотверждаемых композитных гидрогелей на основе фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*

(ФШ) и рекомбинантного спидроина-1 (rS1). В качестве фотоотверждаемого компонента материалов выступал метакриловый желатин (МЖ), для инициации полимеризации был использован высоко реакционноспособный дифенил (2,4,6-триметилбензоил) фосфиноксид (ТРО).

Одной из задач исследования являлся подбор растворителей, подходящих для всех компонентов системы. Из ФШ могут быть получены водные растворы, что предпочтительно для биосовместимых материалов, однако ТРО нерастворим в воде. Поэтому в смесь был включен диметилсульфоксид (ДМСО) – сильный апротонный биполярный растворитель с относительно низкой токсичностью. Двухкомпонентная система растворителей ДМСО-вода позволила получить стабильные растворы с высоким содержанием ФШ (в соотношениях 1:2 и 1:1 к МЖ), и содержащие ТРО в необходимой для иницирования фотополимеризации концентрации. Так как rS1 нерастворим в воде или ДМСО, в качестве растворителя для системы на основе rS1 использовали муравьиную кислоту.

Из смесей были получены гидрогели в виде дисков диаметром 15 мм и толщиной 5 мм. Также с использованием оптической системы микроскопа EclipseTi-E с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония) из композитных материалов на поверхности покровных стекол были созданы микроструктуры в виде полос с толщиной не более 5 мкм. Для их получения был использован объектив PlanFluorDIC 40x/1,30 Oil и лазер с длиной волны 405 нм.

Биосовместимость гидрогелей была оценена *in vitro* на иммортализованных клеточных культурах, таких как фибробласты линии 3T3 и остеобластоподобные клетки MG-63, а также на первичных эмбриональных фибробластах и мезенхимальных стволовых клетках мыши. Исследование показало, что полученные гидрогели могут быть использованы в качестве субстрата для культивирования клеток и не оказывают цитотоксического эффекта.

Таким образом, были получены новые биосовместимые фотоотверждаемые композитные смеси на основе структурных белков шелка. Были сформированы как гидрогели макроскопических размеров, которые могут быть использованы для создания тканеинженерных конструкций, так и микроструктуры, что указывает на потенциальную возможность использования данных материалов для метода лазерной стереолитографии.

Финансирование исследования: *Работа осуществляется при поддержке Минобрнауки РФ по Соглашению по предоставлению субсидии от 26 сентября 2017 г. № 14.604.21.0167, «Создание функционализированного композитного фотоотверждаемого биоразлагаемого материала на основе структурного белка шелка и метакриловых производных желатина», уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60417X0167.*

**Белоглазова И.Б.<sup>1,2</sup>, Молокотина Ю.Д.<sup>1</sup>,  
Зубкова Е.С.<sup>1,2</sup>, Шевченко Е.К.<sup>1,2</sup>,  
Болдырева М.А.<sup>1,2</sup>, Макаревич П.И.<sup>2</sup>,  
Стафеев Ю.С.<sup>1,2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Лаборатория ангиогенеза,  
НИИ экспериментальной кардиологии,  
ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
yulia.molokotina@mail.ru

### **ВЫБОР ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ- МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ФАКТОР РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ И ИННЕРВАЦИИ ИШЕМИЗИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ**

Генетическая модификация стволовых/прогениторных клеток для увеличения продукции факторов роста позволяет значительно повысить эффективность клеточной терапии. Важным аспектом получения генетически-модифицированных клеток является выбор вектора для модификации. Целью данной работы было получение мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ), гиперпродуцирующих гепатоцитарный фактор роста (HGF), обладающий ангиогенными, антифиброзными и нейротекторными свойствами, и выбор оптимального вирусного вектора для их модификации. Мы сравнивали влияние модификации МСК ЖТ человека лентивирусом 3 поколения (ЛВ) и аденоассоциированным вирусом второго серотипа (ААВ), несущими ген HGF человека. Было обнаружено, что модификация ЛВ позволяла увеличить экспрессию продукта трансгена в 6 раз больше, чем модификация ААВ. При исследовании влияния генетической модификации на экспрессионный профиль клеток было обнаружено, что помимо значительного возрастания мРНК HGF как при ААВ, так и при ЛВ трансдукции, наблюдается значительное увеличение мРНК рецептора HGF c-мет, рецептора урокиназы – uPAR и фактора роста фибробластов – FGF2 в модифицированных МСК ЖТ. Генетическая модификация МСК ЖТ как ААВ, так и ЛВ независимо от используемого трансгена (HGF или GFP) умеренно снижала пролиферацию этих клеток. Кондиционированная среда МСК ЖТ, модифицированных как ЛВ, так и ААВ с геном HGF, стимулировала ангиогенез в модели образования капиллярноподобных структур на Матригеле клетками эндотелия пупочной вены (HUVEC). Однако, в другой модели ангиогенеза – отрастание сосуноподобных структур от декстрановых бус, покрытых HUVEC – добавление к ним МСК ЖТ, модифицированных ЛВ, как с GFP, так и с HGF, подавляло отрастание микрососудов. В то же время со-культивирование с МСК ЖТ, модифицированных ААВ с геном HGF, оказывало выраженный стимулирующий эффект на отрастание сосуноподобных структур от декстрановых бус, увеличивая в 2,5 раза длину формирующихся отростков уже на 3 день со-культивирования и количество отростков по сравнению с эффектом немодифицированных клеток. Полученные результаты позволили нам выбрать для дальнейшей работы

модификацию ААВ с HGF, несмотря на то, что экспрессия и секреция HGF были больше при трансдукции ЛВ. Механизм подавления ангиогенеза при сокультивировании HUVES с МСК ЖТ, модифицированными ЛВ, будет нами изучен в дальнейших работах. Также наши дальнейшие исследования будут направлены на получение тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из модифицированных МСК ЖТ для стимуляции ангиогенеза и восстановления нарушенной иннервации ишемизированной задней конечности мыши.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ 16-45-03007.*

**Моргун Е.И.<sup>1</sup>, Роговая О.С.<sup>2</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Московский физико-технический институт*

<sup>2</sup> *Институт биологии развития РАН им. Кольцова*  
lady.morgun2016@yandex.ru

**РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ И ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩЕЙ КОЖНОЙ РАНЫ У МЫШЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ**

Хронические ишемические раны имеют гетерогенную природу, в зависимости от этиологии, возраста раны и других факторов, влияющих на раневое заживление [SashwatiR. et al.; 2009]. Ишемические язвы существуют длительно и трудно поддаются консервативной терапии [Толстых П.И. и др.; 2013]. На сегодняшний день не существует стандартизированной модели на лабораторных животных, с помощью которой возможно было бы оценивать влияние различных агентов на рану [Could L. J. et al.; 2005, Shwarz D. et al.; 1995, Wong V. W. et al.; 2011]. Целью нашего исследования является моделирование на мышцах ишемизированной длительно незаживающей раны и ее морфологическое описание. В эксперименте были использованы мыши линии balb/c весом 18–20 г. Все животные были разделены на экспериментальные и контрольные группы. Манипуляции с мышцами производились под общим наркозом. Мышам из экспериментальных групп наносились полнослойные параллельные разрезы кожи, симметричные относительно позвоночника, длиной 30 мм, на расстоянии 10 мм, причем необходимым условием было отсечение от полученного лоскута всех крупных сосудов, таким образом мы получали частично изолированный лоскут кожи с нарушением кровоснабжения. По центру лоскута наносилась полнослойная циркулярная рана диаметром 5–7 мм. Далее на края лоскута накладывались хирургические швы. Животным из контрольных групп после мы наносили полнослойную рану в той же позиции, которая соответствовала середине лоскута мышцей из экспериментальных групп. Далее всем животным производилось шинирование раны с целью предотвращения контракции. Гистологические исследования ран проводили на седьмые и десятые сутки после начала эксперимента. В ходе работы установлено, что кожный лоскут выбранного размера без дополнительной изолирующей подложки у мышцей из экспериментальных групп имеет такие гистологические признаки ишемии, как экстравазация сосудов, инфильтрация воспалительных клеток и дегенеративные изменения в ткани. Раны оставались открытыми вплоть до 10-х сут. от начала эксперимента, на гистологических срезах наблюдалась миграция воспалительных клеток в зоне

краев раны. У животных из контрольных групп на седьмой день наблюдали процесс раневого заживления, а на десятый день закрытие раны. Разница в скорости закрытия ран в экспериментальных и контрольных группах составила 3–4 дня, что является длительным сроком для мыши. В районе раневого ложа наблюдалось обилие компонентов, характерных для соединительной ткани, а также обильное прорастание сосудов. Края раны имели практически нормальную гистологическую структуру, характерную для эпителия кожи. На данной модели планируется изучать стимулирующее влияние различных лекарственных средств, в т.ч. тканеинженерных конструкций и клеточных препаратов на регенерацию кожной раны. Полученные результаты лягут в основу дальнейшего исследования, направленного на изучение регенерационных процессов в модели ишемизированной раны. Работа выполняется в рамках государственного задания № 0108-2016-0005.

Финансирование исследования: *Работа выполняется в рамках государственного задания № 0108-2016-0005.*

**Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П.,  
Родина А.В., Высоцкая О.В., Глухов А.И.,  
Арзуманов С.С., Посыпанова Г.А.**

*НИЦ «Курчатовский институт»*  
moskalevaey@mail.ru

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ МЫШИ, ДЛЯ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клеточной терапии часто предполагает этап культивирования для увеличения их количества. При этом отдельные МСК могут трансформироваться в опухолевые стволовые клетки в результате накопления мутаций и инициировать рост опухоли. Целью работы явилась характеристика МСК из костного мозга (КМ), головного мозга (ГМ) и из жировой ткани (ЖТ) мыши и изучение возможности их злокачественной трансформации при длительном культивировании. МСК выделяли из тканей мышцей линии C57Bl/6 по способности прикрепляться к поверхности культуральных флаконов, культивировали и на разных пассажах исследовали с помощью проточной цитометрии уровень экспрессии антигенов, характеризующих фенотип МСК: Sca-1, CD9, CD45 и CD11b, а также нестина — одного из маркеров СК, CD140 $\alpha$  — рецептора тромбоцитарного фактора роста  $\alpha$ , и размер субпопуляции прогениторных клеток с фенотипом Sca-1/CD140 $\alpha$ . Активность теломеразы в экстрактах из МСК определяли с помощью метода TRAP. Для оценки туморогенной активности 1 млн МСК вводили подкожно в 0,1 мл культуральной среды сингенным мышам в область правой лопатки. Все изученные МСК экспрессировали антигены Sca-1 и CD9 при отсутствии антигенов CD45 и CD11b, все МСК были способны к дифференцировке в жировую, костную и хрящевую ткань. МСК из разных тканей на 30 пассаже различались по уровню экспрессии нестина: в МСК-КМ доля нестин+ -клеток составила 34,1%, а в МСК-ГМ и МСК-ЖТ 85,0 и 97,9% соответственно. Доля клеток, экспрессирующих антиген CD140 $\alpha$ , в МСК-КМ возростала

к 30 пассажу до 94,5%, в МСК-ГМ — до 16,1%, а в МСК-ЖТ она, наоборот, снижалась с 87,1% на 9 пассаже до 30,6% на 30-м. Популяция клеток с фенотипом Sca-1/CD140 $\alpha$  в МСК-КМ на 30-м пассаже составляла 66%, в МСК-ГМ — 13,6%, а в МСК-ЖТ — 27,0%. Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне накопления прогениторных клеток в популяции МСК-КМ при длительном культивировании, что коррелирует с более низким содержанием нестин<sup>+</sup>-клеток в этих культурах. Наиболее высокая активность теломеразы обнаружена в МСК-КМ — 0,74, в МСК-ГМ — 0,47 и в МСК-ЖТ — 0,24 отн. ед. В МСК-КМ обнаружен низкий уровень секреции цитокинов HGF и IL6. Для определения туморогенной активности МСК проведено 2 серии экспериментов, в каждом из которых использовали по 5 мышей. Обнаружено развитие только 1 опухоли в одной серии опытов, которая появилась через 6 мес. после трансплантации только в случае использования клеток МСК-КМ. После облучения МСК (60Co) в дозе 6 Гр опухоли развивались из МСК-КМ у 5 из 5 мышей. МСК-ЖТ и МСК-ГМ были устойчивы как к спонтанной трансформации, так и к индуцированной облучением. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности к спонтанной и индуцированной злокачественной трансформации только МСК-КМ, особенностью которых был низкий уровень нестина, высокое содержание клеток с фенотипом Sca-1/CD140 $\alpha$  и высокая активность теломеразы. Механизмы устойчивости МСК-ГМ и МСК-ЖТ к злокачественной трансформации предстоит выяснить.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-29-01234.*

**Муравьев А.Н.<sup>1</sup>, Орлова Н.В.<sup>1</sup>,  
Виноградова Т.И.<sup>1</sup>, Юдинцева Н.М.<sup>2</sup>,  
Нащекина Ю.А.<sup>2</sup>, Блинова М.И.<sup>2</sup>,  
Лебедев А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России  
<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН  
urolog5@gmail.com

#### **ОПЫТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО КОМПОЗИТА, СОДЕРЖАЩЕГО АЛЛОГЕННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ДЕФЕКТ СТЕНКИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Тканевая инженерия занимает важное место среди современных научных тенденций. Однако в структуре общего объема публикаций по данной теме урологические аспекты освещены весьма скудно. В настоящее время для замещения нефункционирующего мочевого пузыря (МП) при неэффективности консервативных методов используют фрагменты желудочно-кишечного тракта, что нередко приводит к ряду осложнений. Поэтому в последние годы возрастает заинтересованность урологов методами тканевой инженерии. Успешно опробованы на животных моделях, а затем трансплантированы человеку искусственные мочевые резервуары с использованием аутологичных клеток. Наши исследования направлены на изучение возможности применения клеточных технологий в случаях отсутствия здорового аутологичного материала.

**ЦЕЛЬ.** Изучение возможности применения многокомпонентного трансплантата с использованием аллогенных клеток для замещения дефекта стенки МП в экспериментальных условиях.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) кролика выделены по стандартной методике после забора красного костного мозга из гребня подвздошной кости кролика. Клетки мечены суперпарамагнитными наночастицами на основе магнетита. В качестве материала для приготовления матрицы использован полимер на основе молочной кислоты — поли-L,L-лактид. Приготовленный многокомпонентный композит на основе полилактидной матрицы, заселенный мечеными клетками трансплантирован *in vivo* после парциальной резекции МП кролика. Период наблюдения составил 2,5 мес. В конце периода наблюдения выполнена магнитно-резонансная томография. Животное выведено из эксперимента с использованием препаратов золетил и рометар в дозах, в 3 раза превышающих терапевтическую.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Животное перенесло операцию хорошо. Рана зажила первичным натяжением. Катетер удален на 14-е сут. За период наблюдения в анализах крови и мочи не зафиксировано патологических сдвигов, также отмечался адекватный прирост массы тела кролика. На серии магнитно-резонансных томограмм виден заполненный мочевой пузырь нормальной емкости. В месте имплантации визуализируется наводящий артефакт от введенных в клетки железосодержащих наноструктур. При макроскопическом осмотре патологических изменений со стороны внутренних органов не выявлено. Отмечается отсутствие явлений отторжения трансплантата, имеются признаки васкуляризации пересаженного лоскута.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проведенный эксперимент открывает большие возможности для исследований в области реконструкции стенки МП. Разработка методик создания многокомпонентного трансплантата с использованием аллогенных клеток может способствовать улучшению результатов лечения патологий, при которых получение аутологичного материала не представляется возможным. Однако, вопрос применения МСК в клинической практике пока остается открытым, уникальные свойства этих клеток представляют собой огромный научный интерес. Полученные на сегодняшний день результаты хоть и являются обнадеживающими, но требуют более детального изучения.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00091-16 и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00068.*

**Муравьев А.Н.<sup>1</sup>, Шейхов М.Г.<sup>1</sup>,  
Юдинцева Н.М.<sup>2</sup>, Виноградова Т.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России  
<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН  
urolog5@gmail.com

#### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Сморщивание мочевого пузыря при его туберкулезном поражении является тяжелым, инвалидизирующим заболеванием. Отсутствие адек-

ватного лечения может вызывать различного рода осложнений. В настоящее время известны способы как хирургической, так и патогенетической профилактики сморщивания мочевого пузыря при туберкулезе, однако их эффективность не превышает 50%. При полной утрате мочевым пузырем накопительной и эвакуаторной функции в результате его туберкулезного сморщивания остается единственный выход — замещение его изолированным участком желудочно-кишечного тракта, что чревато серьезными осложнениями. Поэтому существует необходимость в разработке новых методов профилактики и лечения малого мочевого пузыря туберкулезной этиологии.

**ЦЕЛЬ.** Обосновать возможность применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулезного сморщивания мочевого пузыря.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Работа подразумевает создание экспериментальной модели туберкулеза мочевого пузыря, для чего интраоперационно проводили инокуляцию культуры *M. tuberculosis Erdman* (107 КОЕ/0,2 мл) под слизистую оболочку мочевого пузыря кроликов-самцов породы Шиншилла. Через месяц после создания модели туберкулезного поражения мочевого пузыря начинали проводить стандартную противотуберкулезную химиотерапию (ПТТ). По завершении интенсивной фазы ПТТ (через 2 мес.) в схему лечения ввели аллогенные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), суспензией которых инфильтрировали стенку мочевого пузыря. Животные разделены на 4 группы: 1-я — интактные кролики (4), 2-я — контроль заражения (6), 3-я — зараженные туберкулезом и леченные по стандартной схеме противотуберкулезной химиотерапии (10) и 4-я группа — кролики, которым через 2 мес. противотуберкулезного лечения в стенку мочевого пузыря трансплантировали аллогенные МСК (5). Одним из основных оцениваемых параметров была максимальная цистометрическая емкость мочевого пузыря, которую регистрировали интраоперационно. Животных выводили из эксперимента с использованием препаратов золетил и рометар в дозах, в 3 раза превышающих терапевтическую.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Максимальная цистометрическая емкость мочевого пузыря интактных животных составила в среднем 33,0 мл. Через месяц после заражения туберкулезом, она снизилась до 14,5 мл. Через 2 месяца интенсивной ПТТ отмечено некоторое восстановление емкости мочевого пузыря (до 22,0 мл в 3-й группе и 20,0 мл — в 4-й). У животных 2 группы — дальнейшее снижение емкости до 11,0 мл. Через 2 мес., после введения аллогенных МСК емкость мочевого пузыря увеличивается до нормальной (28,0 мл). При этом МСК определялись в криосрезах стенки мочевого пузыря, жизнеспособность их подтверждена с помощью прижизненной окраски РКН26 с дополнительной окраской ядер DAPI.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Применение аллогенных МСК в комплексной терапии туберкулеза мочевого пузыря в эксперименте ограничивает развитие рубцово-спаечного процесса и способствует профилактике сморщивания мочевого пузыря.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00091-16 и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00068.*

**Мусина Л.А., Шангина О.Р., Муслимов С.А., Корнилаева Г.Г., Соловьева Е.П., Хасанов Р.А.**

*ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»  
morphoplant@mail.ru*

### **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АЛЛОГЕННЫЙ БИОМАТЕРИАЛ — МАТРИЦА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

В офтальмохирургии при глаукоме, невритах и атрофии зрительного нерва широко применяются модифицированные аллогенные губчатые биоматериалы. Они обладают выраженными упруго-эластическими и сорбционными свойствами, позволяющими использовать их при замене или восстановлении тканей с дренажной функцией.

**ЦЕЛЬ.** Анализ структурных изменений губчатых биоматериалов после дренирующих операций в отдаленные сроки у экспериментальных животных и пациентов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** На моделях кортикостероидной глаукомы и токсического неврита зрительного нерва у кроликов проводились дренирующие операции при помощи аллогенных спонч-дренажей (спонч-аллопланты). Исследовали на 60, 90, 180 сут. Исследованы 4 энуклеированных по медицинским показаниям глазных яблока пациентов после антиглаукоматозной операции (через 1, 3, 3,5 и 8 лет) и 1 глазное яблоко пациента после операции дренирования заднего отдела глаза при неврите (через 1 год). Использовали гистологические и электронно-микроскопические методы.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Аллогенный губчатый биоматериал для восстановления дренажных путей обладает высокой биосовместимостью. После имплантации в глазное яблоко кроликов с кортикостероидной глаукомой не усугубляет имеющиеся патологические изменения окружающих тканей. Передняя часть его свободно выступает в просвет угла передней камеры глаза. Спонч-дренажи не рассасываются в тканях реципиента и способствуют восстановлению физиологического оттока внутриглазной жидкости, а вследствие этого и понижению внутриглазного давления при глаукоме. При токсическом неврите зрительного нерва у кроликов спонч-аллоплант в супрахориоидальном пространстве, обладая выраженными дренажными свойствами, способствует нормализации оттока жидкости в заднем отрезке глаза, снятию отеков и ослаблению степени выраженности патологических процессов в зрительном нерве и окружающих его тканях. Отдельные кровеносные сосуды хориоидеи прорастают внутрь ячеек губчатого биоматериала, создавая за счет формирования коллатералей дополнительное питание для оболочек глаза. Эти процессы замедляют развитие неврита и атрофии зрительного нерва. Спустя даже 8 лет спонч-дренажи, помещенные в ткани глаза пациентов при офтальмопатологии, не подвергаются процессам рубцевания, что очень важно для результата операций. Стенки ячеек большей части пористых биоматериалов формируют подобие трабекул, длительно не рассасываются и не смыкаются. Со временем многие трабекулы выстилаются одним слоем вытянутых отростчатых эндотелиальных клеток с крупными ядрами и светлой цитоплазмой со множеством везикул и пиноцитозных пузырьков.

Модифицированный губчатый биоматериал служит матрицей для регенерации эндотелиальных клеток, что создает условия для прохождения потоков жидкости внутри его пор и улучшения физиологического оттока жидкости в глазу при патологии.

**Муслимов С.А., Лебедева А.И.**

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России  
msagi@mail.ru

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ В РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ВВЕДЕНИЕ АЛЛОГЕННОГО И КСЕНОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛОВ**

Одним из направлений в регенеративной медицине является использование внеклеточного матрикса из волокнистой соединительной ткани, как для самостоятельного применения, так и для создания тканеинженерных конструкций. Считается, что имплантированный биоматериал подвергается с течением времени лизису с последующей резорбцией продуктов его биодеградации. У исследователей нет единого мнения о стереотипности этого процесса при использовании аллогенных и ксеногенных биоматериалов. Исходя из этого, целью нашего исследования явилось выявление возможных различий в динамике морфологических изменений в зоне имплантации аллогенных и ксеногенных биоматериалов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследования проведены на 54 крысах Вистар обоего пола, которым создавали дефект подкожной клетчатки в объеме около 1 см<sup>3</sup> и заполняли диспергированным биоматериалом из сухожилий в виде суспензии на физиологическом растворе. В первой серии вводили аллогенный биоматериал Аллоплант (ДАБ), а во второй серии — ксеногенный биоматериал (ДКБ), взятый у кроликов. Животных выводили из эксперимента в сроки 4, 7, 14, 30 и 90 сут. Использовали гистологические (окраска гематоксилином и эозином, а также по Ван-Гизону, Маллори и Футу), электронномикроскопические и иммуногистохимические методы (выявление экспрессии TGF-1 — трансформирующего фактора роста, TNF- — фактора некроза опухолей, PCNA — ядерного антигена пролиферирующих клеток, виментина).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Морфологический анализ клеточного инфильтрата в воспалительном процессе, развившемся после нанесения травмы и имплантации биоматериалов, показал что главные различия наблюдаются в выраженности макрофагальной стадии воспаления. Через 4 сут. количество макрофагов в месте введения ДАБ более чем в два раза превышало количество макрофагов после имплантации ДКБ. Причем, рост числа клеток происходил преимущественно за счет привлечения к месту имплантации костномозговых предшественников мононуклеарных фагоцитов, а не путем пролиферации тканевых макрофагов, о чем свидетельствовало отсутствие экспрессии PCNA. Изменения в ультраструктуре макрофагов в процессе резорбции и замещения ДАБ указывают на созревание моноцитов в высокодифференцированные клетки с активной фагоцитарной и секреторной функцией. Ультраструктура макрофагов, активированных продуктами резорбции ДКБ, была совершенно иной. Большинство макрофагов имели признаки функционального исто-

щения, указывающие на угнетение фагоцитарно-секреторной функции. В период 7—14 сут. обнаруживались эпителиоидные клетки, трансформирующиеся в гигантские клетки инородных, что свидетельствует о хронизации воспаления. Наряду с резорбцией имплантированных частиц ДАБ макрофагами происходило формирование диффузного тонковолокнистого регенерата с сетью пучков коллагеновых волокон, окрашивающиеся по Футу (коллаген I типа), что указывает на формирование зрелой соединительной ткани. При имплантации ДКБ на фоне дефицита макрофагов и проявления их фагоцитарной и секреторной несостоятельности обнаруживались лимфоциты и мезенхимные (виментин-положительные) клетки, что является признаком иммунного воспаления, протекающего по типу гиперчувствительности замедленного типа и переходе в хроническую форму. Совокупность описанных явлений способствовала образованию вокруг ДКБ фиброзной капсулы. Динамика экспрессии цитокинов коррелировала с изменениями в клеточных популяциях: при имплантации ДАБ обнаруживалась более высокая экспрессия TNF- по сравнению с экспрессией TGF-1, особенно в начальные сроки эксперимента, что свидетельствует о преобладании макрофагов с M1 фенотипом. Как известно, TGF-1 является индуктором фиброза, а TNF- оказывает супрессорное действие на его активность.

Таким образом, при введении аллогенного и ксеногенного биоматериалов наблюдаются различия в соотношении популяций M1/M2 макрофагов, что отражается на динамике экспрессии TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$  и, следовательно, структуре ткани, замещающей резорбирующиеся биоматериалы.

Финансирование исследования: *Бюджет.*

**Мухамедшина Я.О.<sup>1</sup>, Шульман И.А.<sup>1,2</sup>, Огурцов С.В.<sup>1,2</sup>, Костенников А.А.<sup>1</sup>, Закирова Е.Ю.<sup>1</sup>, Масгутов Р.Ф.<sup>1,2</sup>, Масгутова Г.А.<sup>1</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный университет

<sup>2</sup> Республиканская клиническая больница Минздрава Республики Татарстан  
yana.k-z-n@mail.ru

**КЛЕТочНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИНОГО МОЗГА: ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА КРУПНЫХ ЖИВОТНЫХ (СВИНЬИ)**

Тысячи людей во всем мире страдают от последствий травматического повреждения спинного мозга (ТСМ). ТСМ приводит к нарушению чувствительной и двигательной функции, неизбежно ведущих к глубокой инвалидизации. Создание новых терапевтических подходов для лечения последствий ТСМ, позволяющих восстановить функцию, является крайне необходимым и может помочь в значительном продвижении клинической медицины. На сегодняшний день наибольшие перспективы связывают с регенеративной медициной, которая направлена на поддержание естественных процессов заживления при реконструкции тканей и органов, создавая условия, при которых поврежденная или утраченная ткань может полностью восстановиться. Разработанные на сегодняшний день подходы регенеративной медицины включают трансплантацию стволовых и прогениторных клеток, манипулирование собственными

клетками пациента и использование скаффолдов. В последнее время наиболее активно развивается направление, нацеленное на стимулирование регенерации различных тканей и органов при помощи стволовых клеток, заключенных в биополимерные матриксы. Такие технологии используют для поддержания и направленной дифференцировки заключенных в матрикс клеток, создания для них специфического микроокружения, соответствующего естественному. Кроме того, системное, интраспинальное и интратекальное введения имеют важные недостатки, связанные с количественными ограничениями и низкой жизнеспособностью стволовых клеток *in situ*. Таким образом, использование биоматериалов, способных инкапсулировать и поддерживать стволовые клетки в целом представляет собой перспективный подход для нейрорегенерации, потенциально улучшая эффективность используемой клеточной терапии. В данной работе мы исследовали эффективность наложения на область повреждения спинного мозга свиньи (подострый период) аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), заключенных в фибриновый матрикс Tissucol. Эксперименты были проведены на вьетнамских вислобрюхих свиньях, половозрелых самках весом 9–12 кг. Животным под наркозом на уровне Th11 спинного мозга после ламинэктомии наносили ТСМ вертикально падающим металлическим стержнем весом 50 г с высоты 20 см с последующей компрессией тем же грузом в течение 10 мин. Через 6 нед. после нанесения травмы на область повреждения накладывали МСК (8 млн) из жировой ткани, заключенные в фибриновый матрикс Tissucol (Baxter, 150 мкл). Животным контрольной группы в аналогичных условиях эксперимента накладывали Tissucol без клеток. Результаты исследования свидетельствуют, что применение МСК способно стимулировать посттравматическую регенерацию спинного мозга свиньи, что проявляется в виде улучшения восстановления двигательной функции, а также увеличения сохранности ткани и снижения посттравматической кавитации.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60101 (Мухамедшина Я.О.).*

**Балябин А.В.<sup>1</sup>, Тихобразова О.П.<sup>2</sup>,  
Понятовская А.С.<sup>2</sup>, Коротченко С.А.<sup>2</sup>,  
Давыденко Д.В.<sup>1</sup>, Гладков А.А.<sup>2,3</sup>,  
Пимашкин А.С.<sup>3</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Приволжский федеральный исследовательский медицинский центр» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» mukhinaiv@mail.ru

#### **КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

Проблема лечения последствий тяжелой черепно-мозговой травмы, инсульта и ряда других нейродегенеративных процессов является наиболее сложной и социально значимой проблемой современной медицины, как в России, так и во всем мире, поскольку данная патология являются одной из главных причин смертности населения и инвалидизации его, вслед-

ствие снижения когнитивного потенциала. Новые терапевтические подходы в нейротрансплантации направлены на снижение негативных последствий, преимущественно, именно таких вторичных поражений. В качестве альтернативного способа может применяться трансплантация нейральных клеток на матрице-носителе (скаффолде), как потенциально новая стратегия восстановления и регенерации поврежденного мозга. Наиболее актуальным является разработка адекватных носителей для трансплантируемых клеток, которые бы создавали определенное микроокружение при длительном процессе восстановления нейронных сетей, а также поддерживали структуру мозговой ткани до ее восстановления. В настоящее время считается, что такими носителями являются пористые гидрогели, позволяющие клеткам и питательным веществам проникать в матрикс, а продуктам жизнедеятельности выводиться в объем организма, оптимальны с точки зрения механической совместимости с тканями головного и спинного мозга.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В представленной работе в качестве скаффолдов использовали многофункциональные гидрогелевые матриксы на основе высокомолекулярных хитозана и гиалуроновой кислоты, полученные методом 2-х фотонной полимеризации (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН). Материал скаффолда на основе хитозана и гиалуроновой кислоты не токсичен, биосовместим с диссоциированными клетками мозга мышей. Для изучения фундаментальных механизмов восстановления нарушенных травмой нейронных сетей мозга использовался разработанный микрофлюидный клеточный чип на основе мультieleктродных матриц, позволяющий визуализировать процессы роста и репарации синаптических контактов, функциональных связей в 2-х и 3-х мерных плоскостях, изучать воздействие различных нейротрофических факторов, стимулирующих рост аксонов и дендритов, тестировать токсичность и безопасность различных клеточных продуктов. В проведенных исследованиях показано, что трансплантация скаффолда через 7 сут. после травмы мозга сохраняет способность животных к обучению условным рефлексам и актуализации следов кратковременной и долговременной памяти через 5 мес. после травмы в отличие от контроля. Вероятно, что поддержание объема мозга в посттравматическом периоде за счет скаффолда в течение первого месяца по данным МРТ, предупреждает нарушение работы нейронных сетей мозга, что обуславливает лучшее восстановление когнитивных и рефлекторных функций ЦНС по сравнению с контролем. Разработанные нейроинженерные микрофлюидные чипы со специально спроектированными каналами для направленного роста аксонов и формирования синапсов позволяют изучать развитие и восстановление после повреждения нейронных сетей в 3-х мерном пространстве.

**Надеждин С.В., Бурда Ю.Е., Зубарева Е.В., Иванов М.Б., Волковняк Н.Н., Беляева В.С., Мовчан Е.**

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
sergey\_nadezhdin@yahoo.com

**ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЗАСЕЛЕНИИ ТРЕХМЕРНОЙ ТИТАНОВОЙ МАТРИЦЫ**

В настоящее время стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки являются важным объектом исследований в регенеративной биологии и медицине, особенно там, где можно использовать заложенный природой их прогениторный потенциал. Целью настоящего исследования явилось изучение способности мезенхимальных стволовых клеток пролиферировать в трехмерной титановой матрице — материала для замещения костных дефектов. Пористая титановая матрица была получена спеканием в вакууме при температуре 1350°C из порошка титана HfTi-1 (производство Richest Group Ltd., Китай, методом гидрирования-дегидрирования губки), предварительно подвергнутого холодному изостатическому прессованию (3000 бар) с временным порообразователем. Открытая пористость материала составляла 47%. Размер пор варьировал в диапазоне 100–500 мкм, толщина матрицы 4 мм. Нанокристаллический гидроксиапатит (нГАП) получали синтезом из водных растворов исходных ингредиентов — насыщенного раствора гидроксида кальция (Ca(OH)<sub>2</sub>) и раствора ортофосфорной кислоты (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из костного мозга большеберцовой кости крысы. МСК культивировали в питательной среде DMEM (содержание глюкозы 1 г/л), сL-глутамином (2 mM), антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сыворотке в присутствии 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Суспензию МСК в количестве 100 мкл наносили на поверхность трехмерных титановых матриц, которые находились в лунках 24-луночных планшетов (планшет «А» — матрица без нГАП, планшет «Б» — матрица обогащенная нГАП). МСК культивировали в течение 2 нед. Затем в каждую лунку добавляли флуоресцентный зонд CalciumGreen™-1, AM, и MitoTracker® RedCMXRos, исследование матриц, содержащих МСК, осуществляли на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе NikonDIGITALECLIPSE C1plus. В ходе исследования было установлено, что пролиферация МСК проходит более интенсивно на матрицах, где отсутствует нГАП, клетки проросли матрицу полностью. Противоположная картина отмечается на матрицах, обогащенных нГАП, здесь МСК проросли на половину матрицы. Интересно отметить, что количество клеток на матрицах без нГАП было больше (157,40±32,37 шт.) чем на матрицах с нГАП (32,40±7,73 шт.) при p<0,01, что может быть связано с запуском механизмов дифференцировки фибробластоподобных клеток в остеогенном направлении. Это обстоятельство подтверждается увеличением интенсивности флуоресценции индикатора кальция Ca<sup>2+</sup> у клеток на матрице с нГАП (1766,50±148,86 у.е.) по сравнению с клетками на матрице без нГАП (1068,20±283,16 у.е.) при p<0,01. Наряду с этим митохондриальный трансмембранный потенциал в клетках не имел достоверных различий, что объяснимо энергоемкостью про-

цессов как пролиферации, так и дифференцировки. Таким образом, для костнопластических материалов важным компонентом является наличие биологически активных веществ, поддерживающих пролиферацию МСК, а не только их дифференцировку в остеогенном направлении.

**Накохов Р.З., Губарева Е.А., Кувейда Е.В., Сотниченко А.С., Гуменюк И.С., Каде А.Х., Могиляная Г.М.**

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»  
nrz00009@gmail.com

**ОЦЕНКА ПРОАНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПИЩЕВОДА НА МОДЕЛИ КРЫС**

Тканеинженерные конструкции (ТИК), созданные на основе биологического или синтетического каркаса и аутологичных клеток реципиента, призваны заменить отсутствующие или поврежденные в результате патологии органы и ткани. Одной из ключевых задач сосудистой сети в данных ТИК является снабжение всех клеток ткани достаточным количеством питательных веществ, то есть все клетки должны находиться на расстоянии не более 200 мкм от сосуда. Данная величина обычно рассматривается как предел возможной диффузии кислорода и питательных веществ в пределах ткани. При создании сосудистых сетей тканеинженерных конструкций важно, прежде всего, их качество: сосудистая сеть должна быть хорошо организованной и зрелой. Это обеспечит перфузию достаточного количества крови по всему объему ткани. Особенности кровоснабжения является серьезной проблемой для тканевой инженерии пищевода. В тканеинженерной конструкции пищевода требуется наличие сети кровеносных сосудов после имплантации, которая необходима для обеспечения клеток питательными веществами, что в дальнейшем будет способствовать более быстрой регенерации тканей.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В работе использовали 10 взрослых крыс-самцов линии Wistar весом 210±25 г (5 крысам была проведена ортотопическая трансплантация ТИК пищевода, 5 крыс составили группу контроля). Децеллюляризацию пищевода выполняли перфузионным детергент-энзиматическим методом, описанным ранее. Для оценки ангиогенеза в ТИК пищевода проведены иммуногистохимические исследования с использованием моноклональных антител к VEGF и фактору фон Виллебранда.

Результаты исследования показали, что восстановление кровоснабжения трансплантата происходит за счет прорастания новых сосудов в основном со стороны нативного пищевода. Образование новой сосудистой сети в трансплантате должно обеспечивать перфузию достаточного количества крови по всему объему ТИК пищевода. Полученные результаты продемонстрировали наличие проангиогенных свойств ТИК пищевода.

Финансирование исследования: *Комплексная НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоракальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».*



**Наместникова Д.Д.<sup>1</sup>, Губский И.Л.<sup>1</sup>,  
Сухинич К.К.<sup>2</sup>, Мельников П.А.<sup>3</sup>,  
Габашвили А.Н.<sup>4</sup>, Соловьева А.А.<sup>1</sup>,  
Губский Л.В.<sup>1</sup>, Ярыгин К.Н.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

<sup>2</sup> Институт биологии развития

им. Н.К. Кольцова РАН

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского»

<sup>4</sup> НИИ биомедицинской химии

им. В.Н. Ореховича

dadnam89@gmail.com

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ  
В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА:  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, МИГРАЦИЯ  
КЛЕТОК И ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ  
ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ У КРЫС**

**ВВЕДЕНИЕ И ЦЕЛИ.** Внутриартериальная трансплантация мезенхимальных стволовых (или стромальных) клеток (МСК) может ускорить функциональное восстановление после ишемического инсульта, что было показано у животных на экспериментальных моделях ишемии, а также у людей во время первых клинических испытаний. Внутриартериальный способ введения позволяет осуществить непосредственную доставку МСК в головной мозг, минуя паренхиматозные органы, что является его главным преимуществом. Однако в литературе есть сообщения о нежелательных побочных эффектах такой трансплантации, наиболее тяжелым из которых является церебральная эмболия. Кроме того, механизмы положительных эффектов МСК, их распределение и миграция изучены недостаточно. Целью нашего исследования было подобрать оптимальные условия для безопасной внутриартериальной трансплантации МСК крысам с острой фокальной ишемией головного мозга, оценить ее терапевтический эффект и исследовать миграцию и хоуминг пересаженных клеток.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ** Здоровым самцам крыс линии Wistar ( $n = 25$ ) и крысам через 24 после моделирования острой фокальной ишемии ( $n = 30$ ) были внутриартериально введены МСК, меченые магнитными микрочастицами в различных дозах (от  $2 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$ ), с различной скоростью, с поддержанием или перекрытием кровотока по внутренней сонной артерии. Для оценки осложнений, терапевтического эффекта и распределения МСК выполнялось магнитно-резонансное (МР) исследование мозга, оценка неврологического статуса животных и постмортальное гистологическое исследование на 1, 7 и 14 день после моделирования острого ишемического инсульта.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.** Нами были определены оптимальные параметры внутриартериального введения МСК:  $5 \times 10^5$  клеток в 1 мл, со скоростью введения 100 мкл/мин и с поддержанием кровотока во внутренней сонной артерии. У животных, которым вводили МСК с соблюдением этих условий, мы наблюдали значительное уменьшение размера инфаркта на 7 день и функциональное восстановление к 14 дню. Таким образом, оптимизация параметров инфузии позволяет добиться положительного терапевтического эффекта без эмболических осложнений. МСК визуализировались по периферии зоны

инфаркта мозга, преимущественно вокруг кровеносных сосудов в полушарии введения.

Финансирование исследования: Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-29-07116, программы фундаментальных исследований РАН 2013-2020 (номер темы № 0518-2014-0005).

**Науменко Е.А., Закирова Е.Ю., Гурьянов И.Д.,  
Фахруллин Р.Ф.**

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

enaumenko81@mail.ru

**РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖИ И КОСТНОЙ  
ТКАНИ У СОБАК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
БИОРАЗЛАГАЕМОГО НАНОКОМПОЗИТА**

В настоящее время большое количество исследований посвящено разработке наномодифицированных биополимерных композитов. В частности, биоразлагаемые материалы находят свое применение в тканевой инженерии для регенерации дефектов различных тканей. Модификация таких материалов наночастицами увеличивает их механическую прочность, адгезионные свойства, а также позволяет изменять термическую стабильность. В свою очередь, модификация наночастиц позволяет создавать материалы с различными функциональными характеристиками. Керамические наночастицы, в частности нанотрубки минерала галлуазита, получают широкое распространение для модификации материалов для тканевой инженерии из-за отсутствия токсичности и широких возможностей модификации. В нашей работе методом лиофильного высушивания был получен пористый гидрогель на основе природных биоразлагаемых полимеров (агароза, желатин, хитозан). Введение 3–6% галлуазита в состав биополимерной композиции приводило к увеличению его механической прочности и термической стабильности. Материал был изучен на предмет биосовместимости *in vitro* с использованием различных культур клеток млекопитающих, а также *in vivo*, путём имплантации гидрогеля под кожу крыс. Дальнейшее наблюдение показало отсутствие выраженной реакции отторжения. Гистологическое исследование выявило, что полная резорбция материала происходила за 6 нед., а восстановление кровотока в области имплантации наблюдалось уже через 3 нед. Мы использовали этот материал в качестве носителя для стволовых клеток при регенерации дефекта кожи, а также для восстановления дефекта костной ткани у собак. В случае дефекта кожи регенерация значительно ускорялась по сравнению с самостоятельным заживлением раны. Использование биополимерных матриц в сочетании со стволовыми клетками и традиционными хирургическими техниками способствовало ускорению регенерации костной ткани с последующим полным срастанием костных отломков, что было подтверждено рентгенологическими исследованиями. В обоих случаях отсутствовали проявления реакции отторжения.

Финансирование исследования: Эта работа была частично поддержана грантом РФФИ 15-04-99660 и выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

**Нащекина Ю.А., Юдинцева Н.М.,  
Никонов П.О., Александрова С.А.,  
Смагина Л.В., Воронкина И.В., Шевцов М.А.,  
Блинова М.И.**

ФГБНУ «Институт цитологии» РАН  
ulychka@mail.ru

**БИМЕДИЦИНСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ  
НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ  
ПОЛИМЕРОВ И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
ДЛЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ  
КОСТНОЙ ТКАНИ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В настоящее время в регенеративной медицине при восстановлении различных органов и тканей находят широкое применение методы клеточной терапии и тканевой инженерии. Выращенные в культуре клетки вместе с биodeградируемыми полимерными носителями переносятся в область повреждения. Несмотря на успешные результаты и накопленный опыт в этой области, во многих клинических случаях полного восстановления повреждённых или утраченных тканей достичь невозможно. Одной из причин этого является отсутствие знаний и понимания биохимических процессов, которые происходят *in vitro* в процессе формирования биомедицинских клеточных продуктов из клеток и полимерных носителей. Реакция организма на трансплантацию таких продуктов также недостаточно изучена.

**ЦЕЛЬ.** Оценка способности клеток синтезировать компоненты внеклеточного матрикса при культивировании *in vitro* внутри трёхмерных полимерных носителей, а также исследование влияния клеточных продуктов на состав раневого экссудата и окружающие ткани.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Композиционные полилактидные носители с различной архитектурой получали методом фазового разделения из поли(L,L-лактида) и выщелачивания солей кальция и коллагенового геля. В процессе культивирования стромальных клеток *in vitro* внутри полилактидных носителей в присутствии и в отсутствие солей кальция и коллагенового геля оценивали способность клеток синтезировать остеокальцин, остеопагин, щелочную фосфатазу и белки внеклеточного матрикса. После трансплантации носителей и клеток в костную ткань лабораторных животных изучали скорость резорбции носителей, иммуногистохимию и гистологию окружающих тканей, а также биохимический состав раневого экссудата.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В процессе выполнения работы были получены биомедицинские клеточные продукты с разной архитектурой полимерных носителей, с размером пор в диапазоне 50–250 мкм и разным содержанием коллагена и солей кальция. Показано, что наибольшее количество остеокальцина и остеопагина образуется в композитных носителях с солями кальция. Присутствие коллагенового геля способствует синтезу клетками таких белков внеклеточного матрикса как фибронектин, костный морфогенетический белок и ламинин. Имплантация полученных носителей и клеток в область костного дефекта кролика наглядно продемонстрировала эффективность регенеративных процессов костной ткани. Показано, что присутствие коллагена и солей кальция в биомедицинских клеточных продуктах после 60 сут. их трансплантации в костный дефект, способствует снижению матриксных металлопротеиназ в ране по сравнению с контролем — рана без трансплантации клеток и полимеров.

**ВЫВОДЫ.** Полученные биомедицинские клеточные продукты могут быть использованы для реконструкции повреждённой костной ткани различной степени тяжести.

Финансирование исследования: *Работа выполнена на средства гранта РНФ № 14-50-00068.*

**Низяева Н.В.<sup>1</sup>, Сухачева Т.В.<sup>2</sup>, Серов Р.А.<sup>2</sup>,  
Куликова Г.В.<sup>1</sup>, Наговицына М.Н.<sup>1</sup>,  
Павлович С.В.<sup>1</sup>, Щеголев А.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России  
Nizyaeva@gmail.com

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ  
И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
ТЕЛОЦИТОВ ПЛАЦЕНТЫ  
ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ**

Ворсины плаценты разных типов отличаются друг от друга количеством стромы, а также различной степенью васкуляризации. При акушерской патологии эти показатели меняются. Кроме того, появились отдельные данные, свидетельствующие о наличии в структурах плаценты так называемых телоцитов (Тц). Однако вопрос об их значении остаётся открытым, в частности, практически не изучены особенности строения Тц при физиологической беременности и преэклампсии.

**ЦЕЛЬ.** Изучение особенностей ультраструктуры и иммуногистохимии клеток стромы ворсин плаценты и телоцитов при преэклампсии.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование было выполнено на образцах плацент, полученных после кесарева сечения от 37 женщин репродуктивного возраста, 25–39 нед. гестации, из которых у 22 пациенток диагностирована преэклампсия (ПЭ): 12 пациенток страдали тяжелой ПЭ, а 10 — с умеренной ПЭ, а также 15 плацент от женщин с физиологической беременностью. Было выполнено гистологическое (окраска гематоксилин и эозин), и иммуногистохимическое исследование с применением антител к CD117, CD34, SMA, виментину, а также к TMEM16a (DOG-1), а также 15 образцов были исследованы под трансмиссионным электронным микроскопом.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** В ворсинах плаценты нами было отмечено, что в зависимости от типа ворсин популяция Тц гетерогенна, представлена как минимум тремя типами: в незрелых промежуточных ворсинах (I тип), в зрелых промежуточных ворсинах — веретенообразными Тц в (II тип; расположенными под базальной мембраной трофобласта), а также звездчатыми Тц в центре ворсин (III тип). В терминальных ворсинах Тц обнаружено не было. В стволовых ворсинах клетки имели строение миофибробластов. При ПЭ Тц были единичными или отсутствовали, отмечались «переходные формы» — Тц с признаками фиброцитов (значительное утолщение отростков, содержание гранулированного эндоплазматического ретикулума было увеличено). При физиологической беременности иммуногистохимическая экспрессия CD117, CD34, SMA, виментин, TMEM16a присутствовала в стволовых и промежуточных ворсинах, но при ПЭ была — вариabельна,

а окрашивание ТМЕМ16а отсутствовало. Кроме того, были отмечены депозиты коллагена, что вызывало деформацию ворсин, нарушение васкуляризации ворсинчатого дерева, а также утолщение гемоплацентарного барьера. Вероятно, помимо описанных функций пейсмекерных клеток, Тц могут обладать и другими функциями, включая иммуномодулирующую и регуляцию ангиогенеза.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, нами установлено наличие в плаценте гетерогенной популяции Тц, отличающихся локализацией, иммунофенотипом и ультраструктурными характеристиками. Тц могут являться ключевым фактором в развитии и дифференцировке ворсинчатого дерева при физиологической беременности, потеря этого резерва, являющегося своеобразной нишей для регенерации и роста ворсинчатого дерева, обуславливает развитие акушерской патологии.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме «Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, эпигенетических факторов в развитии преэклампсии» № 116-08-22-1-000-2.*

**Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Васильев С.А.<sup>1,2</sup>, Мензоров А.Г.<sup>3,4</sup>, Кашеварова А.А.<sup>1,2</sup>, Чурилова А.В.<sup>2</sup>, Гридина М.М.<sup>3</sup>, Беляева Е.О.<sup>1</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет

<sup>3</sup> ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет  
t.nikitina@medgenetics.ru

### **ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК С КОЛЬЦЕВЫМИ ХРОМОСОМАМИ И АНАЛИЗ ИХ СТАБИЛЬНОСТИ В СОМАТИЧЕСКИХ И ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ**

Кольцевые хромосомы возникают вследствие слияния двух концов одной хромосомы и отличаются повышенной митотической нестабильностью. Интерес к поведению кольцевых хромосом *in vitro* возрос в связи с новыми данными о том, что плюрипотентные клетки с кольцевыми хромосомами могут быть терминальными и неделяющимися [Bershteynet al., 2014]. Механизм эффективного избавления от кольцевой хромосомы в ИПСК мог бы стать основой для разработки универсального метода коррекции хромосомных дефектов, для чего необходим анализ «поведения» кольцевых хромосом в плюрипотентных клетках. Материал был получен от двух пациентов с кариотипами 46,XY(r13) и 46,XX(r22). С помощью FISH с центромероспецифичными зондами и зондами на дистальную область длинного плеча хромосом 13 и 22 изучено соотношение клонов клеток с кольцевой хромосомой и с ее потерей в различных клеточных популяциях (лимфоциты периферической крови, первичные линии фибробластов и линии ИПСК). Мозаичные моносомии с потерей кольцевой хромосомы выявлены в 39% и 8% лимфоцитов у пациентов с r13 и r22 соответственно. При культивировании фибробластов динамика кариотипов отличалась между линиями: в фибробластах с r22 доля

моносомных клеток постепенно возрастала (с 24% на П1 до 42% на П33 ( $2 = 6,649$ ,  $P < 0,05$ )), тогда как в фибробластах с r13 направленных изменений не выявлено (50% на П2, 41% на П5, 38% на П7 и 56% на П9). В фибробластах с r13 на 5-9 пассажах отмечена весьма высокая частота микроядер (МЯ) с наличием центрального сигнала 13/21, равная 3,3%, причем в 1,4% клеток МЯ содержали по 2 сигнала, что, скорее всего, соответствует отставанию обеих хроматид кольцевой хромосомы. Линии ИПСК были получены из фибробластов путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека с использованием лентивирусных векторов LeGO. Получены 2 клон с r22 и 3 клон с r13, морфологически соответствующие ИПСК, подтверждение их плюрипотентности проводится. Показано, что на ранних пассажах клетки с кольцевой хромосомой сохранились в качестве модального класса во всех полученных клонах ИПСК: 87% на П11 и 94% на П9 в двух клонах с r22; 90% на П5, 86% на П7, 87% на П5 в трех клонах с r13. Это говорит об относительной стабильности кольцевых хромосом 13 и 22 в плюрипотентных клетках. Для определения частоты потери и замещения кольцевой хромосомы в ИПСК планируется провести субклонирование.

Финансирование исследования: *грант Российской государственной академии наук № 16-15-10231.*

**Никифоров Н.Г.<sup>1</sup>, Елизова Н.В.<sup>2</sup>, Орехов А.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

<sup>3</sup> ООО «Научно-исследовательский институт атеросклероза» (Сколково)  
nikiforov.mipt@googlemail.com

### **РАЗРАБОТКА ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

**ЦЕЛЬ.** Атеросклероз — причина половины смертей во всем мире. Иницирующее событие атерогенеза — накопление липидов клетками стенок артерий. Причем, развитие атеросклероза сопровождается хроническим воспалительным процессом. Ранее мы обнаружили значительные индивидуальные различия в способности циркулирующих моноцитов человека, ключевых клеток врожденного иммунитета, к провоспалительной активации, причем у больных атеросклерозом эта способность была ниже, чем у моноцитов здоровых доноров. Результаты этих исследований позволили разработать клеточные модели для скрининга веществ, способных предотвращать накопление липидов и обладающих иммунокорректирующими свойствами.

**МЕТОДЫ.** Моноциты выделяли из крови испытуемых в градиенте плотности с последующей селекцией CD14+ клеток методом магнитной аффинной хроматографии. Затем моноциты культивировались в течение 7 дней. В качестве индуктора внутриклеточного накопления липидов использовали сыворотку крови больных атеросклерозом в количестве 20% от объема культуральной среды. В качестве контроля использовали сыворотку здоровых доноров, не вызывающую накопления липидов. Через 24 ч. после инкубации клеток с сывороткой проводили измерение внутриклеточного холестерина. В качестве индуктора провоспалительного ответа использовали

интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) в конечной концентрации 100 нг/мл. Маркером степени провоспалительной активации служила степень экспрессии фактора некроза опухоли альфа.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Модель *in vitro*. С помощью этой модели изучали способность исследуемого вещества предотвращать накопление липидов под влиянием атерогенной сыворотки. При устойчивости культивируемых моноцитов в присутствии тестируемого вещества к накоплению липидов результат считали положительным. При снижении активации моноцитов, стимулированных ИФН- $\gamma$ , результат считали условно положительным. В случае положительных результатов в модели *in vitro*, препарат тестировали в модели *ex vivo*. Модель *ex vivo*. Исследуемое вещество давали добровольцам с атерогенной сывороткой крови, т.е. способной индуцировать патологическое накопление холестерина в модели *in vitro*. Затем проводили серию сбора образцов крови через 0, 2, 4 и 6 ч. Сыворотку из этих образцов крови добавляли к культуре моноцитов. Снижение атерогенности сыворотки крови испытуемого считали положительным результатом. Из коллекции образцов крови (0, 2, 4 и 6 ч.) выделяли моноциты и исследовали их способность активироваться под влиянием ИФН- $\gamma$ . Снижение провоспалительной активации считали условно положительным результатом. В данном исследовании было успешно протестировано 5 препаратов (Алликор, Везуген, Целлекс, Кардиошелз, SkQ1).

**ВЫВОДЫ.** Разработанные клеточные модели *in vitro* и *ex vivo* на основе первичной культуры моноцитов человека могут быть использованы для поиска потенциальных иммунокорректоров и разработки антиатерогенных препаратов.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Министерством образования и науки (заявка на грант № 2017-14-585-0008-4014).*

**Николаев А.А.<sup>1</sup>, Маркитантова Ю.В.<sup>2</sup>, Григорян Э.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН  
nik2396@mail.ru

**ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У URODELLA ПУТЕМ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ РПЭ**

Нарушение топологической и функциональной связи клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фоторецепторов нейральной сетчатки приводит у амфибий (*Urodela*) к разворачиванию процессов естественного репрограммирования (ЕР) РПЭ, которые, в свою очередь, ведут к образованию из эпителиальных клеток новых клеточных фенотипов – нейрального и глиального. Это позволяет РПЭ этих животных при удалении исходной сетчатки формировать ее регенерат, а в сетчатке с погибающими клетками, встраиваться и замещать потери. В работе использован оригинальный способ повреждения сетчатки у тритона *P. waltl*. ярким светом, приводящий после частичной гибели фоторецепторов и отслойки сетчатки к инициации и прогрессу ЕР клеток РПЭ в нейральном направлении. Отметим, что разобщение РПЭ и сетчатки у млекопитающих и человека ведет к мезенхимной трансформации РПЭ и развитию,

в результате, ряда патологий, в частности, пролиферативной витреоретинопатии. Различия в поведении клеток РПЭ глаз тритона и млекопитающих могут быть заложены либо (исходно) в их компетенции, либо формируются на самых ранних этапах ЕР в результате эпигенетических изменений или различающихся экзогенных регуляций клеточного поведения. Именно перечисленные события, несмотря на давно известный феномен ЕР для РПЭ амфибий, оказались наименее изученными. Целью работы стала характеристика клеток РПЭ тритона, только вступивших на путь ЕР, но не вошедших еще в пролиферативную фазу. Частными задачами работы стало описание состояния хроматина в ядрах нативных клеток в слое РПЭ и клеток в состоянии ЕР, покинувших слой РПЭ и мигрирующих в толщу отслоенной сетчатки и иммуногистохимическое выявление экспрессии ряда белков. Описана локализация и белка контактов клеток РПЭ ZO-1, в нативных клетках и после разобщения РПЭ с облученной ярким светом сетчаткой. В клетках, вступивших на путь смены фенотипа, обнаружено снижение экспрессии и перераспределение белка ZO-1 с латеральных поверхностей на базальную сторону клеток с дальнейшим (по мере выхода из слоя РПЭ) ингибированием экспрессии и распределением белка по всей поверхности репрограммируемых клеток. В исследовании экспрессии и локализации белка теплового шока низкой мол. массы HSP-20 в клетках РПЭ облученных светом животных обнаружен четко различимый сигнал, отсутствующий в РПЭ нативных глаз. При применении маркера пролиферации (антитела к фосфогистону) показано отсутствие пролиферативной активности РПЭ. Используя изображения, полученные с полутонких срезов облученных ярким светом глаз тритона, с помощью компьютерной программы оценены отличия в конденсации хроматина в сравнении с таковыми для нативных клеток. Выявлено преобладание в 1,67 раз конденсированного хроматина в репрограммируемых клетках. На том же материале делаются попытки изучения закономерностей распределения хроматина в ядрах нативных и клеток РПЭ в состоянии ЕР. В попытке расширить наши представления о молекулярно-генетических и эпигенетических механизмах процесса ЕР на уникальной модели тканевой регенерации сетчатки намечены также: выявление экспрессии эмбрионального гистона В-4, транскрипционного фактора KLF-4 и других факторов, определяющих особенности клеток РПЭ тритона для их ЕР в нейральном/глиальном направлениях, но запрещающие мезенхимную трансформацию. Полученные данные могут быть транслированы в офтальмологический раздел биомедицины.

Финансирование исследования: *Грант Программа Президиума РАН Биоразнообразие.*

**Нимирицкий П.П., Макаревич О.А.,  
Еремичев Р.Ю., Ефименко А.Ю.,  
Макаревич П.И.**

*Институт регенеративной медицины МНОЦ  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
nimiritsky@gmail.com*

### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ В СОСТАВЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ПОВЫШАЕТ РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МСК**

Мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) активно используются в регенеративной медицине благодаря своей способности к самовоспроизведению и дифференцировке в соединительнотканые клеточные элементы. Однако клиническая эффективность применения МСК в целом ряде исследований оказалась намного ниже ожидаемой. Причиной этому может быть этап культивирования МСК, при котором они находятся вне микроокружения, присутствующего в ткани *in vivo*, которое получило название «ниши стволовой клетки». В этих условиях регенеративный потенциал МСК может значительно снижаться, а этап подготовки клеток к инъекционному введению является дополнительным фактором стресса, который уменьшает жизнеспособность клеток. Выходом из этой ситуации оказался подход с аппликацией клеток в составе тканеинженерных конструкций. В них клетки находятся в более физиологичном окружении, что, в конечном счете, повышает эффективность терапии по сравнению с суспензионным введением. Одним из типов таких тканеинженерных конструкторов являются клеточные пласты (КП), состоящие из нескольких слоев клеток и внеклеточного матрикса между ними. Такие клеточные пласты могут иметь достаточную плотность для того, чтобы проводить с ними манипуляции при хирургическом вмешательстве. В составе КП МСК окружены внеклеточным матриксом, формируют межклеточные контакты и находятся под контролем целого спектра секретлируемых белков, что моделирует более физиологичное окружение клеток. В настоящее время считается, что введенные в ткань МСК участвуют в регенерации не за счет замещения поврежденных клеток дифференцированными потомками самих МСК, а с помощью паракринного действия. Предположив, что в составе клеточного пласта секреторная активность МСК будет выше, чем в монослое, мы попытались сравнить продукцию белков в различных условиях культивирования. В работе нами использованы МСК жировой ткани человека, иммортализованные введением гена теломеразы (линия «ASC52Telo», ATCC, США), которые в одинаковом количестве были высажены на планшеты различного формата для формирования КП или монослоя. Далее мы собирали культуральную среду этих клеток и анализировали её методом ИФА. Мы обнаружили повышение продукции клетками в составе КП таких важных в регенерации белков как VEGF, PDGF-BB, HGF, PECAM-1, G-CSF в 2–3 раза, а IL-8, лептина и ангиопоэтина в 8–12 раз по сравнению с монослоем. Предполагается, что *in vivo* МСК могут являться универсальным компонентом ниши тканеспецифичных стволовых клеток, участвуя в формировании стромального компонента. Можно предположить, что в составе КП происходит восстановление микроархитектуры стромы ниши (нарабатываются белки матрикса), а также секреторного окружения. Таким образом,

МСК в составе клеточных пластов могут обладать более выраженной способностью поддерживать и активировать собственные стволовые клетки пациента. Полученные результаты позволяют предположить, что МСК в составе тканеинженерных конструкций могут быть более эффективны не только из-за улучшения выживаемости, но и вследствие повышения регенеративного потенциала, который связан с их секреторной активностью и формированием окружения, более близкого к нативной нише в ткани.

Финансирование исследования: *Исследование велось с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФ № 14-50-00029 и поддержано грантами РФФИ № 17-04-01452 (оценка паракринной функции) и Президента РФ № МК-2422-2017-7\_151622 (гистологические исследования).*

**Нузова О.Б., Стадников А.А.**

*Оренбургский государственный медицинский университет  
nuzova\_27@mail.ru*

### **ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА P53 И ЭКСПРЕССИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА BCL-2 В ОБОСНОВАНИИ НОВОГО СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Лечение трофических язв нижних конечностей является одной из важнейших проблем медицины. Продолжается поиск новых и более эффективных методов и средств местного применения, обладающих оптимизирующим воздействием на репаративные гистогенезы. Цель исследования – обосновать эффективность местного сочетанного применения милацила и магнитолазеротерапии в комплексном лечении трофических язв нижних конечностей на основе иммуноцитохимической идентификации экспрессии проапоптотического белка p53 и экспрессии антиапоптотического белка bcl-2. Клинические исследования охватывают 250 больных с трофическими язвами нижних конечностей различного генеза. Изучение лечебной эффективности сочетанного местного применения милацила и магнитолазеротерапии проведено у 122 больных с трофическими язвами (основная группа). У 68 пациентов I контрольной группы в комплексном лечении трофических язв местно использовали милацил и лазерное излучение, у 64 больных II контрольной группы – только милацил и у 48 пациентов III контрольной группы в лечении язв в течение первых 7–10 дней (до очищения язв от гнойно-некротических масс) 1% раствор диоксида, а затем облепиховое масло. К 10 сут. трофические язвы заживали у большинства пациентов основной группы, у больных I контрольной группы к 15 дню лечения, у больных II группы к 21 дню, у пациентов III группы к 32 сут. Наиболее благоприятные результаты лечения трофических язв у больных основной группы подтверждались морфофункциональными и иммуноцитохимическими исследованиями. При применении милацила и магнитолазеротерапии обнаружено усиление лейкоцитарной и макрофагальной реакции, ускорение купирования воспалительного процесса и отделения некротических масс. Более активным оказалось образование грануляционной ткани за

счет интенсификации васкулогенеза. Это также подтверждалось и исследованием экспрессии проапоптотического белка p53 (%). У пациентов основной группы данный показатель составил  $9,18 \pm 0,15\%$ , что достоверно меньше ( $p < 0,05$ ) в сравнении с аналогичным показателем больных I контрольной группы ( $10,5 \pm 0,26\%$ ), больных II контрольной группы ( $17,85 \pm 1,42\%$ ), и пациентов III контрольной группы ( $20,72 \pm 1,64\%$ ). Милиацил и магнитолазерное излучение стимулируют пролиферативную активность клеток раневой области и приводят к лимитированию апоптотической доминанты. При применении 1% раствора диоксида и облепихового масла обнаружено, что пролиферативная активность клеток была существенно снижена на фоне интенсивной экспрессии белка p53 и подавления экспрессии белка bcl-2. Последний показатель при лечении трофических язв 1% раствором диоксида и облепиховым маслом составил  $0,9 \pm 0,05\%$ . Он был ниже ( $p < 0,05$ ) аналогичного при использовании милиацила ( $1,3 \pm 0,03\%$ ), милиацила и лучей лазера ( $1,5 \pm 0,04\%$ ), милиацила и магнитолазеротерапии ( $1,8 \pm 0,07\%$ ). Проведенными исследованиями установлена высокая эффективность сочетанного применения в комплексном лечении трофических язв милиацила и магнитолазеротерапии.

Финансирование исследования: *Оренбургский государственный медицинский университет и авторы работы.*

**Обухова Л.М.<sup>1</sup>, Ерлыкина Е.И.<sup>1</sup>,  
Медяник И.А.<sup>2</sup>, Яшин К.С.<sup>2</sup>, Пименов В.Г.<sup>3</sup>,  
Евдокимов И.И.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт химии высокочистых веществ им. Г.Г. Девярых» РАН  
ObuhovaLM@yandex.ru

### **РОЛЬ МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПРОЛИФЕРАЦИИ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Влияние элементного гомеостаза на процессы роста, дифференцировки, репарации, регенерации, апоптоза, некроза, выживаемости клеток широко известно. Поскольку имеются данные о возникновении злокачественных новообразований из раковых стволовых клеток, утративших связь с нишей, целью данного исследования стал анализ особенностей элементного гомеостаза нейросфер эмбриональных нейральных клеток мышей и опухолевых новообразований головного мозга.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Изучены нейросферы, полученные из клеток коры головного мозга эмбрионов мышей (E14) на 2-й, 4-й и 6-й день культивирования, культивируемые в DMEM/F12 (In vitro) с добавлением ростовых факторов EGF (In vitro), FGF (Sigma), добавки N2 (In vitro) и L-Glutamin (Sigma), и ткань опухолевых новообразований головного мозга 12 пациентов со злокачественными и 7 пациентов с доброкачественными опухолями головного мозга до проведения лечения. В качестве контроля использовали ткань мозга от трупов 7 человек, погибших в результате травмы (время смерти: до 10 ч.). Уровень макро- и микроэлементов оценивали методом атомно-эмиссионной спектроскопии на спектрометре iCAP6300Duo (ThermoScientific,

США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При исследовании культур нейросфер, полученных из клеток коры головного мозга эмбрионов мышей (E14), показан значительный рост потребления натрия в 5,42 ( $p = 0,009$ ); кальция (в 8,81 раз,  $p = 0,005$ ) и калия (в 60,79 раз,  $p = 0,003$ ). Также культуры нейросфер активно поглощали микроэлементы: марганец, железо и цинк. Выявлено значительное увеличение концентрации кальция (более чем в 7 раз) и натрия (в 5,9 раз) в опухолевой ткани мозга по сравнению с практически здоровыми людьми и пациентами с доброкачественными опухолями. Содержание  $Mg^{2+}$  напротив снижалось в 1,7 раз по сравнению со здоровой тканью мозга. Также в опухолевой ткани возрастало содержание железа, цинка и меди в 3,1; 3,2 и 10 раз соответственно. Рост содержания кальция как в стволовых нейральных клетках, так и в опухолях головного мозга может быть связан с реализацией митогенного сигнала по MAP-киназному сигнальному пути. Роль цинка в активации клеточной пролиферации может быть обусловлена активным включением данного микроэлемента в качестве лиганда белков сигнального пути Hedgehog, а также в структуру антиоксидантных ферментов. Сходный элементный гомеостаз эмбриональных нейральных стволовых клеток и злокачественных опухолей головного мозга позволяет предположить значимую роль таких элементов как кальций, натрий, медь, цинк и железо в механизмах регуляции пролиферации и апоптоза.

**Тюмина О.В., Овчинников П.А., Волчков С.Е.,  
Зазулина Я.А.**

ГБУЗ «МЦ Династия»  
ovchinnikov@cordbank.ru

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ CD34+ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПОСЛЕ РАЗМОРОЗКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКА КРИОГЕННОГО ХРАНЕНИЯ В СИСТЕМЕ BIOARCHIVE**

В международной медицинской практике ежегодно растет потребность в образцах пуповинной крови (ПК), как для аллогенной трансплантации, так и для регенеративной медицины. Соответственно увеличивается значимость банков ПК, и остро возникает вопрос о качестве заготовленных образцов ПК, о содержании в них стволовых клеток и их жизнеспособности.

**ЦЕЛЬ.** Провести анализ жизнеспособности стволовых гемопоэтических (CD34+) клеток ПК в зависимости от срока криогенного хранения, заготовленных Самарским банком пуповинной крови.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** С 2003 г. Самарским банком пуповинной крови заготовлено более 12 500 образцов ПК. Заготовка образцов пуповинной крови проводится после подписания добровольного информированного согласия женщины. Хранение образцов осуществляется в автоматической системе Bioarchive (Thermogenesis, США). Ежегодно проводится валидация процесса обработки и заморозки образцов ПК, заключающаяся в разморозке и подсчете количества и жизнеспособности CD34+ клеток на проточном цитометре FACSCanto (BD, США). Анализ проводился по данным разморозки 521 образца ПК. Из них 186 образцов со сроком хранения до 100 дней; 188 образцов со сроком от 100 до 500 дней; 108 образцов со сроком от 500

до 1000 дней; 39 образцов со сроком свыше 1000 дней. Все образцы обработаны в соответствии со стандартами международной ассоциации банков гемопоэтических стволовых клеток NetCord. Количество CD34+ в образцах составляло  $1,25 \cdot 10^6$  клеток. Жизнеспособность CD34+ после разморозки составила: до 70% – 41 образец; 70–80% – 85 образцов; 80–90% – 156 образцов; свыше 90% – 239 образцов. Статистический анализ данных выполнялся в среде StatPlus:mac(AnalystSoft, США). Ввиду отсутствия нормального распределения меры центральной тенденции выражали в виде медианы и межквартильного размаха. Для выявления значимых корреляций использовались непараметрический критерий Спирмена и линейный регрессионный анализ. Средний показатель срока хранения образцов составил 151 (62; 551) день. Средний показатель жизнеспособности CD34+ клеток после разморозки, вычисленный без стратификации по сроку хранения, составил 88,8 (80,3; 95,7)%. При первичном анализе взаимосвязи показателя жизнеспособности CD34+ клеток и срока хранения получены следующие данные: Spearman's Rho = -0,28854,  $p > 0,05$ . При построении линейной регрессионной модели зависимости показателя жизнеспособности CD34+ клеток от срока хранения статистическая значимость коэффициентов полученного уравнения регрессии не была подтверждена. Выявленная при использовании методов дескриптивной статистики значительная гетерогенность изучаемой выборки по основным клинико-технологическим параметрам обосновывает необходимость использования методов многофакторного анализа для результирующей оценки значимых закономерностей.

**ВЫВОДЫ.** Жизнеспособность стволовых гемопоэтических (CD34+) клеток ПК после разморозки высокая. Отсутствует значимая взаимосвязь показателя жизнеспособности CD34+ клеток после разморозки от срока криогенного хранения.

Финансирование исследования: *средства учреждения.*

#### **Одинцова И.А.**

*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова  
odintsova\_irina@mail.ru*

#### **НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПРОФЕССОРА А.А. МАКСИМОВА В ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ**

Значимость фундаментальных научных трудов выдающегося отечественного гистолога профессора Александра Александровича Максимова известна всему профессиональному сообществу и не нуждается в дополнительных обоснованиях и разъяснениях [1, 2, 3]. Его приоритет в создании унитарной теории кроветворения общепризнан и неоспорим. В современных публикациях об этом ученом уделяется много внимания его биографии и научным заслугам, но педагогическая деятельность остается в тени. В течение двадцати лет из своей достаточно короткой по современным меркам жизни (всего 54 года) профессор А.А. Максимов возглавлял кафедру гистологии и эмбриологии Военно-медицинской академии (ныне носящей имя С.М. Кирова) в своем родном Санкт-Петербурге. Военно-медицинская академия – его alma mater, где он блестяще учился, окончив ее с золотой медалью. В 1903 г. объявили выборы на вакантную должность начальника кафе-

дры гистологии и эмбриологии Императорской Военно-медицинской академии (ИВМА). Была назначена конкурсная комиссия, которая рассмотрела несколько кандидатур и вынесла вердикт: «Максимов продемонстрировал в своих исследованиях разносторонность и тщательность научной мысли, работы его отличаются вообще большой солидностью... Комиссия признает приват-доцента Максимова наиболее достойным кандидатом». Возглавив кафедру, А.А. Максимова не пришлось радикально менять сложившуюся до него систему преподавания, но он серьезно обновил материально-техническую базу, написал блестящий учебник и вдохнул новую жизнь в научно-исследовательскую работу кафедры. Устаревшие, примитивные учебные микроскопы были заменены на новые модели с осветительным аппаратом и револьвером для смены объективов. Были получены новейшие для того времени микроскопы с апохроматами, конденсоры для исследования в темном поле. До первой мировой войны постоянный штат кафедры состоял из профессора, одного профессора (должность, ныне соответствующая ассистенту) и лабораторного служителя. Накануне этих военных событий количество обучающихся в академии значительно увеличилось, вследствие чего для подготовки и проведения практических занятий Максимов пригласил несколько штатных преподавателей, которым полагалась почасовая оплата. В разное время это были доктора Н.П. Тишуткин, С.С. Чашин, Ф.Ф. Сысоев, С.П. Алфеева. Курс эмбриологии с 1905 по 1912 г. вел доктор В.Я. Рубашкин. В 1919 г., благодаря хлопотам начальника кафедры, была введена должность препаратора, на которую назначили третьекурсника ВМА Николая Хлопина, начавшего специализироваться по гистологии под руководством Максимова и впоследствии выросшего в крупного отечественного ученого – академика АМН СССР, возглавлявшего кафедру с 1936 по 1955 г. Кафедру гистологии Максимов возглавлял вплоть до 1922 г. Общеизвестно, что именно этот период стал наиболее плодотворным в научно-педагогической деятельности ученого, вершиной которой стало экспериментально-гистологическое обоснование учения о крови и соединительной ткани [3, 4, 5]. А.А. Максимов значительно расширил исследования разнообразных клеток крови и соединительной ткани, уделяя особое внимание их взаимоотношениям (в современной терминологии это клеточно-дифференциальная организация тканей и междифференциальные взаимоотношения), внедряя новый метод экспериментальной гистологии – метод тканевых культур, который освоил в совершенстве. При А.А. Максимова кафедра гистологии с эмбриологией Военно-медицинской академии приобрела значение одного из центров гистологической мысли. В связи с быстрым развитием науки учебная программа постепенно была изменена, что сопровождалось существенным увеличением часов, отведенных на изучение этих двух дисциплин. Гистологию с эмбриологией преподавали на первом и втором курсах (4 семестра), текущий контроль успеваемости не проводился, т.е. оценку ставили только на экзамене. Основными формами занятий, как и сейчас, были лекции и практические занятия. Посещение лекций было обязательным, но на лекции Максимова курсанты всегда ходили с удовольствием, судя по их воспоминаниям, «лектором он был зажигательным». По воспоминаниям выпускника академии, будущего акаде-

мика АМН СССР С.В. Аничкова, Александр Александрович был «отличным лектором... читал лекции, облаченный в парадный генеральский мундир, усы его были напомажены и концы их торчали вверх, как у императора Вильгельма, пахло от него дорогими духами» [6]. Другой курсант (будущий профессор-отоларинголог К.Л. Хиллов) вспоминал, что Максимов приезжал на лекции верхом на коне в безупречном чистом и наглаженном генеральском мундире, важно входил в переполненную аудиторию и блестяще излагал лекционный материал». В 1914 г. была опубликована первая часть учебника Максимова «Основы гистологии (учение о клетке)», а вторая часть — «Учение о тканях» увидела свет в 1915 г. В предисловии к учебнику сказано, что он построен на систематизированном и несколько дополненном материале лекций, которые автор читал в ИВМА в течение последних 10 лет. Отмечу, что на протяжении XX века многие авторы заимствовали из него части текста и великолепные гистологические рисунки, иногда даже не ссылаясь на первоисточник. Практические занятия были еженедельными. В начале каждого занятия прозектор подробно объяснял особенности гистологических препаратов, которые следовало изучить и зарисовать. Некоторые препараты курсанты должны были изготовить на занятии самостоятельно, для чего каждый слушатель должен был приобрести предметные и покровные стекла. Иногда препараты (чаще всего это были гистологические срезы) требовалось только окрасить и заключить в консервационную среду. Сам профессор А.А. Максимов филигранно владел гистологической техникой и стремился обучить этому курсантов. Контрольными мероприятиями были зачеты по препаратам, которые принимали прозекторы, и экзамен (отдельно за первый и за второй курсы обучения), который принимал лично сам профессор [7]. После революции 1917 г. контингент обучающихся в академии резко изменился. Большею частью это были выходцы из рабочих и крестьянских семей, прибывшие с фронта солдаты. Революционные события и связанные с ними изменения во всех сферах жизни подтолкнули А.А. Максимова к мысли об эмиграции. Его отъезд из России состоялся в 1922 г. и был болезненно воспринят в академических кругах, что вполне объяснимо. Несмотря на негативный резонанс, который на родине имел этот поступок уважаемого во всем мире ученого, его имя не было стерто из скрижалей Военно-медицинской академии. Ему была посвящена часть кафедральной музейной экспозиции, о нем (особенно, начиная с 1970-х годов XX века) вспоминали на лекциях и практических занятиях. В академии регулярно проводились гистологические научные конференции, в том числе, посвященные памяти профессора Максимова. Сотрудниками кафедры гистологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (профессора Н.Г. Хлопин, А.А. Клишов, Р.К. Данилов, В.Г. Гололобов, доцент З.Ф. Шавлаев) в разное время были опубликованы статьи о жизни и деятельности А.А. Максимова. Такая просветительская работа принесла свои плоды. Например, бывший курсант ВМА И.Э. Константинов, будучи в конце XX века в США, по своей инициативе отыскал и на свои средства отреставрировал могилу ученого. Выпускник Военно-медицинской академии Р.В. Деев, с младших курсов занимаясь в научном гистологическом кружке, увлекся исследованием неизвестных стра-

ниц жизни и научного творчества А.А. Максимова, неоднократно публиковал их (часть — в соавторстве) в профильных научных журналах. Роман Вадимович и поныне бережно сохраняет сведения о великом русском ученом-гистологе, популяризирует его имя, ведет дальнейший поиск новой информации. Безусловно, научно-педагогическое наследие А.А. Максимова тщательно сохраняется на кафедре гистологии Военно-медицинской академии. Мы помним, что именно он является основателем научной гистологической школы ВМА, бережем его гистологические препараты и оригинальные рисунки, постоянно пополняем посвященную ему экспозицию в музее кафедры, регулярно проводим учебно-научные конференции курсантов по истории кафедры и академии, по актуальным вопросам современной гистологии, на которых всегда звучит имя талантливого питомца академии доктора медицины, профессора Александра Александровича Максимова.

#### Литература:

1. Данилов Р.К., Гололобов В.Г., Деев Р.В. Александр Александрович Максимов — выдающийся отечественный гистолог (жизнь и научное наследие). Вестник российской Военно-медицинской академии 2001; 2 (6): 54-60.
2. Деев Р.В. Профессор Александр Александрович Максимов: эволюция идей. Гены и клетки 2014; IX (2): 6-14.
3. Клишов А.А. Научная деятельность профессора А.А. Максимова в Военно-медицинской академии. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1988; XCV (12): 86-9.
4. Данилов Р.К. Вклад ученых-гистологов Военно-медицинской академии в разработку учения о тканях. В кн.: Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: гистогенез и регенерация тканей. Труды ВМА. СПб.: ВМедА, 2004.
5. Деев Р.В., Одинцова И.А. Экспериментально-гистологический анализ соединительной ткани и крови (к 140-летию профессора А.А. Максимова). Морфология 2015; 147 (2): 90-4.
6. Аничков С.В. На рубеже двух эпох. Л.: Лениздат, 1981.
7. Шавлаев З.Ф. Развитие сравнительного и экспериментального методов на кафедре гистологии Военно-медицинской академии. Л.: ВМА им. С.М. Кирова, 1972.

#### **Олейникова Н.А., Харлова О.А., Мальков П.Г., Данилова Н.В., Попов П.В., Гайфуллин Н.М.**

МГУ им. М.В. Ломоносова  
ale\_x\_05@mail.ru

#### **РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ «ЗУБЧАТЫХ ОБРАЗОВАНИЙ» ТОЛСТОЙ КИШКИ**

«Зубчатые» образования толстой кишки были расценены как предопухольевые поражения и включены в классификацию ВОЗ в 2010 г. Среди них выделяют: гиперпластический полип (HP); зубчатую аденому/полип на широком основании (SSA/P); традиционную зубчатую аденому (TSA). Современная гипотеза о разности потенциала злокачественности и разной частоте малигнизации «зубчатых» образований побуждает к поиску дополнительных критериев отличия различных морфологических типов полипов. В литературе описаны иммуногистохимические профили экспрессии маркеров белков плотных контактов, маркеров опухолевых стволовых клеток (CSC), маркеров пролиферативной активности и регенераторного потенциала. Ki67 — ядерный белок, уровень которого низок в покоящихся клетках и возрастает в пролиферирующих. CD44 — молекула клеточной адгезии, являющаяся по некоторым данным маркером CSC. В интактной слизистой оболочке толстой



кишки Ki67 и CD44 наблюдаются в нижней трети крипты. В литературе мало данных об экспрессии CD44 и Ki67 в предопухолевых поражениях толстой кишки, в связи с чем целью нашего исследования стала оценка регенераторного потенциала «зубчатых» образований толстой кишки и сравнение его с аденокарциномами и тубулярными (AT) и тубуло-ворсинчатыми (ATV) аденомами толстой кишки.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включено 49 «зубчатых» образований, 32 аденокарциномы и 34 AT и ATV толстой кишки. Проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD44 и Ki67.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано принципиальное отличие ( $p < 0,01$ ) TSA от HP и SSA по уровню Ki67 и локализации реакции Ki67 и CD44: преимущественно в поверхностных отделах в TSA и в базальных отделах в HP и SSA. Учитывая, что в нормальной толстой кишке и CD44, и Ki67 располагаются в базальных отделах крипты в недифференцированных или стволовых клетках, аналогичная локализация этих маркеров в HP и SSA может свидетельствовать о ненарушенных процессах дифференцировки крипты в образованиях этого типа, и, следовательно, об отсутствии формирования истинной опухоли. Между HP и SSA, напротив, различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ) ни по локализации маркеров, ни по их уровню. В 98% «зубчатых образований» толстой кишки выявлена мембранная реакция CD44, в то время как в 56,3% аденокарцином и 41,2% AT и ATV обнаружена нетипичная цитоплазматическая реакция CD44, что свидетельствует о нарушении процессов дифференцировки в этих образованиях.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Нами впервые предложено оценивать не общий уровень реакций CD44 и Ki67, а раздельный для каждой трети крипты для оценки регенераторного потенциала «зубчатых» полипов разных типов. Показано сходство TSA, AT и ATV; сходство HP и SSA и принципиальное отличие этих двух подгрупп друг от друга, что может свидетельствовать о различных путях канцерогенеза. Впервые показана коэкспрессия маркера CSC – CD44 и маркера пролиферативного потенциала – Ki67 по третям крипты в новообразованиях толстой кишки, что свидетельствует о параллельности этих двух процессов при формировании полипов толстой кишки разных типов.

Финансирование исследования: *Работа сделана при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00179 мол\_а.*

**Омельяненко Н.П.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России  
omel156@yandex.ru

**ТКАНЕВЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ УПРАВЛЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫМ ОСТЕОГЕНЕЗОМ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

Особенностью костной репаративной регенерации является многоэтапность течения и зависимость ее исхода от многочисленных факторов. В связи с этим, для получения максимально благоприятного результата – заживление без атипичного тканевого регенерата, восстановление целостности и анатомических параметров поврежденной кости, а также

в полном объеме ее функциональных показателей необходим правильный подбор существующих многочисленных методов воздействия на репаративный процесс, соответствующий характеру повреждения кости. Несмотря на разработку большого количества имплантатов из искусственных материалов, включая резорбируемые, тканевые имплантаты остаются предпочтительными. Это аутологичная, аллогенная и ксеногенная костная ткань. Среди них самым эффективным стимулятором репаративной костной регенерации является эмбриональная фрагментированная костная ткань, обладающая наиболее выраженным остеогенным эффектом. Часто применяемым имплантатом остается деминерализованный костный матрикс. Вышеуказанные тканевые имплантаты обладают локальным пролонгированным действием и не вызывают выраженной воспалительной реакции. На месте их постепенной резорбции образуется первичная (ретикулофиброзная) костная ткань, ремоделируемая в дальнейшем в пластинчатую кость. Возможности применения культивируемых соединительнотканых клеток, получаемых из разных источников, прогрессивно расширяются. В экспериментах на животных была показана наибольшая эффективность в стимуляции костной репаративной регенерации аутологичными стромальными клетками костного мозга. Ключевым моментом в этих экспериментах было время введения клеток в область регенерации. Оно соответствовало завершению воспаления и началу спонтанного остеогенеза. Таким образом, имплантированные клетки попадали в приемлемое тканевое микроокружение и могли стимулировать остеогенез в области регенерации. Полученные в экспериментах результаты дали основание применить разработанную методику в клинической практике, где убедительно был показан выраженный стимулирующий эффект клеточной терапии в отношении формирования и оссификации дистракционных регенератов у детей и взрослых при хирургической коррекции длины конечностей, при врожденных и приобретенных ложных суставах. Результаты применения культивированных аутологичных стромальных клеток позволяют сделать вывод о перспективности их дальнейшего использования для стимуляции репаративной костной регенерации с учетом закономерностей ее течения как индивидуально, так и в комплексе с тканевой терапией для получения максимального терапевтического эффекта.

**Омельяненко Н.П., Курпьяков А.П., Волков А.В., Родионов С.А., Иванов К.С.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им.Н.Н. Приорова» Минздрава России  
omel156@yandex.ru

**ВНУТРИСУСТАВНЫЕ ТЕЛА – ФОРМА СУЩЕСТВОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНотКАННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ В АВТОНОМНЫХ УСЛОВИЯХ IN VIVO**

Внутрисуставные тела появляются в полости сустава в результате синовиального хондроматоза (первичные), а также травматических повреждений суставного хряща (вторичные). Эти образования способны длительно существовать в полости сустава, порой до нескольких лет. При этом не про-

исходит их некротического распада, а напротив, они могут увеличиваться в размерах и подвергаться энхондральной оссификации. Феномен длительного автономного существования соединительнотканного образования в полости сустава без структурной связи с суставным хрящом, субхондральной костью и синовиальной оболочкой и определил наш интерес к нему. Суставные тела были исследованы методами светооптической и электронной микроскопии. Также проводилась оценка структурной динамики соединительнотканых клеток, выделенных из суставных тел, в процессе культивирования. Показано, что внутрисуставные тела включают все разновидности соединительной ткани и имеют общий принцип построения. Их центральная часть может быть представлена губчатой костью, межбалочные пространства которой заполнены жировой тканью. Костная ткань окружена волокнистой соединительной тканью, а также гиалиноподобным хрящом. Эти ткани не имеют четких границ между собой и переходят одна в другую. Гиалиноподобная хрящевая ткань располагается в непосредственной близости у хрящевых клеток и построена из неориентированных тонких коллагеновых фибрилл диаметром 20–40 нм. Межклеточный матрикс волокнистой ткани построен из коллагеновых волокон, в состав которых входят параллельно расположенные коллагеновые фибриллы, диаметром 50–80 нм. В отдельных участках коллагеновые волокна образуют ячеистую структуру, внутри которой находится гиалиноподобная хрящевая ткань. Наблюдается очаговая минерализация последней. Подобно матричному полиморфизму имеет место и клеточный полиморфизм. В состав суставного тела входят фибробласты, остециты, адипоциты и хондроциты. Выделенные из внутрисуставных тел соединительнотканые клетки прикрепляются к дну флакона, распластываются и начинают делиться, достигая стадии конфлюэнтного монослоя в течение 7–10 дней. На протяжении всех 10 пассажей культивирования большая часть клеток имела фибробластоподобную форму. В кондиционной среде присутствовал оксипролин и гексуроновые кислоты, указывающие на наличие коллагена и гликозаминогликанов. Таким образом, полученные данные указывают на существенные отличия структуры внутрисуставных тел различного происхождения от структуры нативного суставного хряща. В процессе существования в суставной полости происходит значительное remodelирование исходной структуры межклеточного матрикса и определенная трансформация клеточных элементов внутрисуставного тела. В результате формируется уникальное соединительнотканное образование, способное длительно поддерживать свою жизнедеятельность в полости сустава без структурной связи с суставным хрящом, субхондральной костью и синовиальной оболочкой.

**Дергилев А.И.<sup>1</sup>, Цуканов А.В.<sup>2</sup>, Орлов Ю.Л.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

orlov@bionet.nsc.ru

### **КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ КЛАСТЕРОВ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ**

Анализ механизмов транскрипционной регуляции генов, обеспечивающих поддержание плюрипотентного состояния стволовых клеток, имеет большое значение для исследования механизмов репрограммирования стволовых клеток (Chenet al., 2008; Yuan et al., 2009; Heng et al., 2010; Chia et al., 2010; Орлов и др., 2012, Дергилев и др., 2016). Эта задача включает определение полногеномных карт сайтов связывания регуляторов плюрипотентности транскрипционных факторов NANOG, OCT4, SOX2, KLF4, PRDM14 в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК). Один из ключевых подходов к решению этой задачи — полногеномный компьютерный анализ распределения сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ) в геноме на основе данных ChIP-seq (метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием). Разработан компьютерный метод оценки полноты (насыщения) эксперимента ChIP-seq по определению сайтов в масштабе генома, основанный на экстраполивировании числа определяемых пиков как функции числа прочтений ДНК (глубины секвенирования) в эксперименте. На ЭСК мыши были проведены эксперименты ChIP-seq для ТФ Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, E2f1, Esrrb, CTCF, n-Myc, c-Myc, Smad1, STAT3, Tcfcp2l1, Zfx, Suz12, рассчитаны кластеры сайтов этих факторов. Показана возможность реконструкции регуляторных контуров ТФ на основе расположения сайтов связывания в промоторах генов-мишеней и данных экспрессии генов. Установлено, что ключевые факторы плюрипотентности Oct4, Nanog, Sox2 образуют тесно связанную и консервативную регуляторную сеть (Chenet al., 2008) в геномах человека и мыши. Серия экспериментов ChIP-seq на том же типе клеток была продолжена экспериментами по определению сайтов связывания факторов Eset, Nr5a2, Tbx3, Smad2 (Yuan et al., 2009; Hanet al., 2010, Lee et al., 2011). Используя данные ChIP-seq для профилей связывания ТФ в ЭСК мыши, исследовались кластеры множественного связывания в геномных районах (так называемые, множественные локусы регуляции транскрипции, размером до 500 нт). Учитывая размер генома, число неперекрывающихся промоторных районов и размер сайта, рассчитано, что кластеры, состоящие из 4 и более сайтов, могут рассматриваться как неслучайные ( $p < 0.01$ ). Расчет матрицы сближенности расположения сайтов в геноме, используемой для построения тепловой карты, проводился с помощью собственной компьютерной программы, рассчитывающей для каждого двух независимых экспериментов ChIP-seq число сайтов, расположенных друг от друга на заданном расстоянии (Дергилев и др., 2016). Показана совместная локализация (ко-локализация) сайтов связывания факторов, ответственных за поддержание плюрипотентности: выделен кластер, включающий ТФ из базового набора факторов репрограммирования Oct4-Nanog-Sox2-Klf4 (Chenet al., 2008), подтверждена ко-локализация сайтов связывания факторов n-Myc, c-Myc, Zfx и E2f1, что

свидетельствует о большем взаимодействии данных транскрипционных факторов при поддержании плюрипотентного состояния клетки.

Финансирование исследования: *РФФИ, бюджетный проект ИЦиГ СО РАН 0324-2016-0008.*

**Охоботов Д.А.<sup>1</sup>, Камалов А.А.<sup>1</sup>, Кирпатовский В.И.<sup>1,2</sup>, Сагарадзе Г.Д.<sup>3,4</sup>, Макаревич О.А.<sup>3</sup>, Нимирицкий П.П.<sup>3,4</sup>, Басалова Н.А.<sup>5</sup>, Камалов Д.М.<sup>1</sup>, Осидак Е.О.<sup>6</sup>, Домогатский С.П.<sup>7</sup>, Макаревич П.И.<sup>3</sup>, Акопян Ж.А.<sup>1,4</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт урологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А. Герцена» Минздрава России

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>5</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>6</sup> ООО «ИМТЕК», Москва

<sup>7</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

14072003m@gmail.com

#### **ФОРМИРОВАНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ ГРАНУЛЕМЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА В ИММУНОПРИВИЛЕГИРОВАННУЮ ЗОНУ ЯИЧКА**

Введение различных типов клеток в яички для восстановления сперматогенеза является активно исследуемым экспериментальным подходом для лечения мужского бесплодия. Одним из перспективных клеточных инструментов такого подхода считаются мезенхимные стромальные клетки (МСК). Мы исследовали возможность использования МСК жировой ткани (МСК ЖТ) человека для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма у крыс. МСК были выделены из жировой ткани относительно здоровых пациентов и культивированы в среде роста, поддерживающей недифференцированные МСК человека, до 5 пассажа. Моделирование экспериментального крипторхизма (2 нед.) проводили на 18 половозрелых крысах-самцах, породной группы Wistar, в возрасте 3,5–4,0 месяца, стандартных весовых характеристик. В одной группе животных перед низведением яичек под их белочную оболочку вводили 0,1 мл смеси 1% коллагенового геля с МСК ЖТ (250 тыс. кл.), во второй группе вводили в таком же объеме суспензию МСК ЖТ без коллагеновой основы (250 тыс. кл.), у части крыс проводили низведение яичек без терапии. МСК ЖТ перед введением метили с помощью BrdU. Оценку выраженности развившихся повреждений в яичках после 2-нед. пребывания в брюшной полости оценивали через 1 мес. после их низведения. При стандартном моделировании абдоминального крипторхизма в течение 2 нед. были достигнуты стойкие нарушения сперматогенеза. При контрольном гистологическом исследовании через 1 мес. у 50% животных первой группы в условиях иммунопривилегированного органа (яичка) было выявлено формирование тканевой гранулемы, морфологически представляющей собой коллагеновые структуры,

хаотично расположенные колонии фибробластов, лейкоцитов, эозинофилов и других клеток, а также атрофичных семенных канальцев и их фрагментов. При этом в тканях яичек определялись отдельные меченые МСК ЖТ. Ни у одного животного, которым вводили суспензию МСК ЖТ без коллагена, таких образований обнаружено не было. Можно предполагать, что МСК ЖТ в полимеризовавшемся после введения в яичко коллагеновом геле оказались спонтанным образом искусственно экранированы от внешних регуляторных сигналов, что могло привести к неуправляемому поведению клеток и в дальнейшем к замещению и разрушению семенных канальцев на фоне выраженной локальной ишемии ткани. Созданные условия после пространственной ориентировки клеток в условиях коллагенового геля привели к тому, что репарационный потенциал МСК был реализован в сторону формирования полиморфной гранулематозной ткани. Таким образом, описанное наблюдение свидетельствует о том, что необходимо учитывать в том числе факторы микроокружения при введении клеточного материала, чтобы избежать получения непредсказуемых результатов.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова, а также с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029.*

**Охоботов Д.А.<sup>1</sup>, Камалов А.А.<sup>1</sup>, Кирпатовский В.И.<sup>1,2</sup>, Сагарадзе Г.Д.<sup>3,4</sup>, Макаревич О.А.<sup>3</sup>, Нимирицкий П.П.<sup>3,4</sup>, Басалова Н.А.<sup>5</sup>, Камалов Д.М.<sup>1</sup>, Осидак Е.О.<sup>6</sup>, Домогатский С.П.<sup>7</sup>, Акопян Ж.А.<sup>1</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт урологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А. Герцена» Минздрава России,

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>5</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>6</sup> ООО «ИМТЕК»

<sup>7</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

14072003m@gmail.com

#### **СТИМУЛЯЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА И ПРОДУКТОВ ИХ СЕКРЕЦИИ НА МОДЕЛИ ДВУХСТОРОННЕГО АБДОМИНАЛЬНОГО КРИПТОРХИЗМА**

Инфертильность супружеской пары сегодня является серьезной социальной и медицинской проблемой. По статистике бесплодна каждая шестая пара, а каждая пятая время от времени испытывает проблемы с зачатием, причем значительная часть случаев приходится на долю мужского бесплодия. Мультифакторность проблемы и отсутствие эффективных лекарственных средств обуславливают актуальность поиска новых средств для стимуляции восстановления сперматогенеза. Наше исследование было посвящено изучению возможности использо-

вания нового биоматериала на основе биологически активных продуктов, секретлируемых мезенхимными стволовыми/стромальными клетками (МСК) человека, и коллагена I типа для стимуляции сперматогенеза. Работа выполнена на 40 половозрелых крысах-самцах, породной группы Wistar, в возрасте 3,5–4,0 месяца, стандартных весовых характеристик. Проведено 6 серий опытов: перед низведением яичек под их белочную оболочку вводили 0,1 мл коллагенового геля с добавлением неконцентрированной или концентрированной кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК жировой ткани человека (МСК ЖТ), или среды культивирования (ДМЕМ) в качестве контроля, или культуры МСК ЖТ (250 тыс.кл.), либо суспензию МСК ЖТ без коллагеновой основы (250 тыс. кл.), у части крыс проводили низведение яичек без терапии. Оценку выраженности развившихся повреждений в яичках после 2-нед. пребывания в брюшной полости оценивали через 1 и 3 мес. после их низведения. Введение под белочную оболочку яичек суспензии МСК ЖТ или кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК ЖТ, комбинированной с коллагеновым гелем, эффективно стимулирует процессы восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма, повышая общее количество сперматозоидов и их подвижную фракцию, способствует уменьшению выраженности гипотрофии крипторхированных яичек, а также приводит к восстановлению уровня андрогенов в крови. Максимальный эффект был отмечен на сроке наблюдения 3 мес. Было выявлено, что интратестикулярная дифференцировка сперматогоний до сперматозоидов происходит при локальном введении концентрированной кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК ЖТ ( $2,25 \pm 0,43$ , при  $p = 0,01$ ), и самих МСК ЖТ с коллагеновой основой ( $5,53 \pm 1,61$ , при  $p = 0,01$ ) и без нее ( $6,42 \pm 0,64$ , при  $p = 0,001$ ). В остальных трех группах была выявлена блокада дифференцировки на уровне сперматогоний 1 и 2 порядка. Важно отметить, что дифференцировка до конечных форм имеет большое прогностическое значение. Таким образом, использование для стимуляции сперматогенеза кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК, включая специфические факторы роста для поддержания жизнеспособности стволовых сперматогенных клеток (например, GDNF, FGF2 и др.), в комбинации с коллагеновым гелем является перспективным подходом для лечения мужского бесплодия и может оказаться более предпочтительным по сравнению с введением самих клеток, учитывая ряд клинических и этических проблем, связанных с трансплантацией клеточного материала.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова, а также с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029.*

**Павлова Г.В., Шамадыкова Д.В., Куст Н.Н., Пантелеев Д.Ю., Ревущин А.В.**

*Институт биологии гена РАН РАН  
lkorochkin@mail.ru*

### **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ GDNF КАК ИНДУКТОР НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ**

Нейротрофический фактор GDNF выполняет функцию выживания и поддержания дифференцировки нервных и глиальных клеток. Подобное свойство GDNF может быть полезно при лечении дегенерации нервных клеток и потери функции дифференцировки, которые характерны при ряде нейродегенеративных заболеваний. GDNF имеет выраженное нейропротекторное действие на дофаминэргические нейроны и мотонейроны спинного мозга, а также стимулирует рост аксонов. На различных моделях болезни Паркинсона было показано, что реккомбинантный GDNF может предотвращать нейротоксически спровоцированную гибель дофаминэргических нейронов и способствует восстановлению их функциональной активности. Однако проведение II фазы клинических испытаний показало отсутствие обнаруженного эффекта у человека. Причина отсутствия эффекта может быть связана с использованием не той изоформы GDNF, которая необходима именно для стимуляции нейральной дифференцировки прогениторных клеток. На данный момент показано, что у человека ген GDNF кодирует два варианта GDNF mPHK, pre-( $\alpha$ )pro-GDNF и укороченный pre-( $\beta$ )pro-GDNF. Причем было обнаружено, что pre-( $\alpha$ )pro-GDNF, секретруется через аппарат Гольджи, а pre-( $\beta$ )pro-GDNF, локализуется в основном в секреторных везикулах и движется по более быстрому секреторному пути. Вероятно, pre-( $\alpha$ )pro-GDNF необходим для выживания нейронов в норме, тогда как pre-( $\beta$ )pro-GDNF необходим как SOS система регенерации при травматической гибели нейронов или при нейродегенеративных заболеваниях. Для исследования значимости pro области для быстрого транспорта и изменения индуктивных свойств фактора нами были сделаны несколько вариантов модифицированных GDNF. Данные модифицированные GDNF были трансплантированы в клетки HEK293 и получены трансгенные линии клеток. Секретция факторов в среду была доказана Вестерн-блот анализом. Среда, кондиционированная культивированием клеток с модифицированными GDNF была добавлена в среду культивируемого эмбрионального спинального ганглия крысы и проанализировано образование нейральных отростков. Было обнаружено, что удаление pro области значительно повышает эффект GDNF, как нейрального индуктора. Аналогичный результат был получен при исследовании культуры разрушенного спинального ганглия и подсчете количества нейральных отростков от клеток. Наибольшей эффективностью обладал mGDNF (с делетированными pre- и pro-областями). Также было показано, что mGDNF оказывает нейротрофическое действие in vitro на клетки PC12. При исследовании in vivo использовалась модель Паркинсона. Модель ранней стадии болезни Паркинсона получали путем подкожного введения 40 мг/кг дофаминэргического пронеуротоксина 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) мышам линии C57Bl/6. Имплантация трансгенных клеток, продуцирующих mGDNF, в каудатум-путамен значительно увеличи-

вала количество тирозингидроксилаза (ТН) иммунопозитивных клеток в черной субстанции и улучшала моторную координацию подопытных мышей.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Программой научных исследований президиума РАН «Фундаментальные основы технологии физиологических адаптаций».*

**Павлова С.В.<sup>1</sup>, Милевская Е.А.<sup>1</sup>,  
Дементьева Е.В.<sup>1</sup>, Чепелева Е.В.<sup>2</sup>,  
Сергеевичев Д.С.<sup>2</sup>, Закиян С.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.  
акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
spav@bionet.nsc.ru

### **МОНИТОРИНГ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ В ПЕРИИНФАРКТНУЮ ЗОНУ МИОКАРДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ**

Одним из перспективных направлений терапии ишемических поражений миокарда является использование клеточных технологий. Кардиальные мезенхимальные c-kit-позитивные клетки продуцируют широкий набор паракринных ангиогенных факторов и способствуют ревазуляризации миокарда в области трансплантации. Ключевым моментом успеха любой клеточной терапии является эффективная трансплантация целевых клеток и их приживание. В данной работе мы оценили эффективность приживания кардиальных мезенхимальных клеток (КМК) после трансплантации в перинфарктную зону на модели острого инфаркта миокарда у крыс. Трансплантацию клеток в миокард проводили в культуральной среде и в фибриновом матриксе. Клетки были модифицированы с помощью лентивирусов геном фермента люциферазы (КМК-Luc). Была показана линейная зависимость активности люциферазы в экстрактах КМК-Luc от их количества, что позволило провести количественную оценку эффективности трансплантации и приживания КМК-Luc в миокарде. В качестве контроля использовали значение люминесценции известного количества клеток, инъецированных в миокард *ex vivo*. Относительное количество люминесценции белкового экстракта миокарда определяли через 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 14 сут. после трансплантации КМК-Luc. Достоверно показано положительное влияние фибринового геля на задержку и выживаемость КМК-Luc в миокарде в течение 7–10 дней. Однако при обоих способах трансплантации клеток на 14 сут. ни в одной из групп люминесценция КСК-Luc не определялась. На основании полученных данных были сделаны выводы, что клетки КМК-Luc сохраняются в миокарде 7–10 дней после трансплантации, что соответствует острому периоду развития инфаркта миокарда и терапевтическому окну, когда любое воздействие, направленное на сохранение жизнеспособного миокарда, имеет решающее влияние на прогноз развития заболевания.

Финансирование исследования: *Грант РФФ № 16-15-10322.*

**Панкина А.П.<sup>1</sup>, Немец Е.А.<sup>2</sup>,  
Севастьянов В.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> АНО «Институт медико-биологических  
исследований и технологий»

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр  
трансплантологии и искусственных органов  
им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России  
amagniya@yandex.ru

### **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ 2D КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИКСОВ НА РЕЗОРБЦИЮ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ОБРАЗЦОВ**

Увеличение биостабильности коллагенсодержащих материалов достигается, в основном, сшивкой глутаровым альдегидом (ГА). Основным недостатком ГА как сшивающего агента является его цитотоксичность. Поэтому поиск новых технологий повышения биостабильности коллагенсодержащих матриксов, предназначенных для применения в тканевой инженерии, остается актуальной задачей.

**ЦЕЛЬ.** Сравнить влияние различных способов стабилизации структуры 2D матриксов из коллагена на скорость их резорбции и цитотоксичность.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Пленки из склерального коллагена I типа (СК) сельскохозяйственных животных получали методом полива. Для стабилизации структуры 2D матриксов применяли: 1. Дегидротермосшивку (10–20 мм рт. ст.; 1200 С; 6–24 ч.). 2. УФ-облучение (16 Вт, 254 нм). 3. Обработкой в парах ГА (комн. темп., 1–7 сут.). Контролем служили образцы с ГА, внесенным в раствор СК в концентрации 0,001–1,0%. Изучали деградацию 2D матриксов под действием коллагеназы (1 ед/мг, рН = 7.4, 37°C, 1 ч.). Цитотоксичность 2D-матриксов определяли согласно ГОСТ ИСО 10993-5 на культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Потеря массы (ПМ) не стабилизированных пленок СК под действием коллагеназы составила 66±9%. В результате дегидротермосшивки биодеградация линейно уменьшалась с увеличением времени обработки и полностью отсутствовала после 18 ч. обработки. УФ-облучение слабо влияло на биодеградацию 2D матриксов (ПМ = 55±5%). Сшивка 2D матриксов в парах ГА сопровождалась повышением их биостабильности. Полное отсутствие ПМ наблюдалось после 24 ч. обработки. Было обнаружено, что в контрольном образце введение ГА в раствор СК в концентрации от 0,001 до 1,0% сопровождалось снижением потери массы образцов от 20±3% до 5±1%, соответственно. Контрольные образцы проявляли выраженную цитотоксичность, возрастающую от «незначительной» до «умеренной» по мере увеличения концентрации сшивающего агента ГА от 0,001 до 1,0%. Фиксация пленок в парах ГА в течение первых 48 ч. оказывает минимальное влияние на цитотоксичность образцов. Затем происходит нарастание цитотоксичности 2D матриксов, достигая к 1 нед. обработки максимального уровня – «резкая цитотоксичность», при которой происходит практически полное разрушение монослоя клеток, контактирующих с исследуемым образцом. Не было обнаружено статистически достоверно значимой разницы между цитотоксичностью образцов СК, обработанных УФ-облучением или дегидротермообработкой, показавших полное отсутствие признаков цитотоксичности.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, оптимальными, с точки зрения эффективности стабилизации структуры и степени цитотоксичности 2D матриц из СК, являются методы дегидротермосшивки (не менее 18 ч. обработки) и фиксация в парах ГА (не более 24 ч.).

Финансирование исследования: *Гос. задание Минздрава России.*

**Панова А.В., Белякова М.Б.**

*Тверской государственный медицинский университет  
raanlip@mail.ru*

**ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БЫЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ В ПРОТОКОЛАХ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ АДИПОЦИТОВ**

Жировая ткань является перспективным источником мультипотентных клеток как для исследований механизмов клеточной дифференцировки, так и прикладного использования в регенеративной медицине. Известны протоколы получения мезенхимных стромальных клеток жировой ткани, МСК-ЖТ (Zuketal, 2002), их адипогенной индукции, а также дедифференцировки первичных культур зрелых адипоцитов жировой ткани, АЖТ (Fernyhough, 2004, Sugihara, 1988). Основная сложность культивирования адипоцитов состоит в их непрочном прикреплении, что делает невозможным длительное культивирование выделенных или полученных *in vitro* адипоцитов и ограничивает экспериментальную работу с ними. Доработка протокола с использованием потолочных культур позволила наблюдать существенное контактное и бесконтактное влияние плотности популяции, быстро возрастающей при инкубации культур на FBS, на дифференцировку МСК и прочность прикрепления адипоцитов. Идеей данного исследования было выявить эффект ограничения пролиферации популяции применением BS в протоколах индуцированного адипогенеза и дедифференцировки адипоцитов на выход клеток, сохранение гомогенности популяции и увеличение времени ее жизни. Испытывали протокол индукции МСК-ЖТ крыс на адипогенез (FBS 10%, DMEM с высокой глюкозой) и протокол дедифференцировки (FBS 10%, DMEM/F12 1:1) АЖТ и адипоцитами, полученными по первому протоколу потолочным прикреплением. После прикрепления клеток к субстрату при очередной смене среды вместо FBS применяли BS. С помощью микроскопии оценивали морфологию клеток и их количество. Показано, что культивирование индуцированных МСК в присутствии BS на этапе дифференцировки (1–12 день от индукции) способствует лучшему прикреплению адипоцитов в донном монослое, а также 3-х кратному увеличению их доли по сравнению с культивированными в FBS за счет ограничения пролиферации. Однако для всплытия созревающих адипоцитов и их прикрепления к потолочному слою сосуда эффективнее среда с FBS, добавленная после оформления адипоцитов донной популяции. В культурах, где дедифференцировка проходила только на фоне FBS, очевиден быстрый рост популяции за счет пролиферации клеток, раньше других потерявших липиды, они легко маскируют пролиферацию МСК, которые могут быть посеяны вместе с АЖТ. Замена в среде FBS на BS через 3–5 дней в нулевом пассаже выравнивает популяцию прак-

тически до гомогенной дедифференцирующейся, с уменьшающимися каплями жира, пластанием клеток и обретением ими фибробластоподобной морфологии. При культивировании в BS оказывается несложно отследить ошибки посева, так как адипоциты медленно меняют морфологию и размножаются с меньшей скоростью, чем МСК. Таким образом, применение бычьей сыворотки в протоколах дифференцировки на адипогенез и дедифференцировки адипоцитов представляется целесообразным для использования полученной популяции в дальнейшем эксперименте и учета количества дифференцированных клеток после этапа прикрепления исходной культуры, и нецелесообразным — на этапе прикрепления потолочной культуры.

**Панова А.В.**

*Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова  
a.v.panova@vigg.ru*

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДО «НАИВНОГО» СОСТОЯНИЯ**

В процессе раннего эмбрионального развития клетки, проходя через ряд последовательных стадий, постепенно теряют свой дифференцировочный потенциал. Несмотря на морфологическое сходство стадий развития разных видов млекопитающих, плюрипотентные стволовые клетки мыши в культуре отличаются от эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека. С момента получения клеточных линий плюрипотентных стволовых клеток постимплантационного эпибласта мыши *in vitro* (ЭписК), стала очевидна схожесть этих клеток с ЭСК человека. Поэтому стало принято различать состояние плюрипотентности «праймированное» — как в ЭписК и у ЭСК человека, и «наивное» — как в ЭСК и в ВКМ предимплантационной бластоцисты мыши. Генетическое репрограммирование соматических клеток человека также устанавливает «праймированное» состояние. Для целей регенеративной медицины необходимо иметь наибольший потенциал дифференцировки и схожесть с модельной системой, в связи этим возникает вопрос — возможно ли получить плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека в «наивном», схожем с состоянием плюрипотентности мыши. Целью нашей работы стало изучение возможности репрограммирование ПСК человека до наивного состояния условиями внешней среды. Нами было показано, что применение специальных условий культивирования приводит к тому, что все линии ПСК меняли морфологию, часть линий приобрела способность к выживанию при пересеве с разбиением колоний до единичных клеток, что несвойственно ПСК человека в «праймированном» состоянии. Все клеточные линии в «наивных» условиях сохраняли маркеры плюрипотентности, однако впервые было показано, что эпигенетическое репрограммирование ПСК человека приводит к гетерогенности колоний по маркеру SSEA-4. Была детально изучена реактивация X хромосомы в женских ПСК. Было показано, что эпигенетическое репрограммирование не приводит к полной реактивации второй X хромосомы. Таким образом, репрограммирование ПСК человека до наивного состояния приводит к эпигенетическим изменениям, но при этом гетерогенность, свойственная ЭСК человека, сохраняется.

**Панова И.Г.<sup>1</sup>, Низяева Н.В.<sup>2</sup>, Полтавцева Р.А.<sup>2</sup>, Синицына В.А.<sup>2</sup>, Щеголев А.И.<sup>2</sup>, Сухих Г.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России  
pinag@mail.ru

**ЭКСПРЕССИЯ TLR4 В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ**

**ВВЕДЕНИЕ.** TLR4–рецепторы экспрессируются на клетках иммунного ряда и относятся к рецепторам врожденного иммунитета. Они способны распознавать консервативные структуры микроорганизмов (бактерий). Сигнал, передающийся в клетку через этот рецептор, функционально близок к рецептору интерлейкина-1 и является одним из древнейших в системе антибактериальной защиты организма. Стимуляция TLR сигнального пути вовлекает MyD88, IRAK и TRAF6, с последующей индукцией I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B фосфорилирует MAPK и, таким образом, способствует активации фактора транскрипции AP-1. В свою очередь, AP-1 инициирует транскрипцию генов, ответственных за пролиферацию, дифференцировку и регуляцию апоптоза. Развитие глаза человека на ранних стадиях гестации сопровождается активными процессами пролиферации и дифференцировки нейронов сетчатки, регрессией гиалиоидных сосудов (апоптоз) и ростом дефинитивных сосудов сетчатки. Возможное участие TLR4 в ранних процессах развития сетчатки предполагает его экспрессию в этой ткани.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать экспрессию TLR4 в тканях глаза плодов человека. Особое внимание было акцентировано на сетчатке.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Образцы глазного яблока 9 и 15 нед. гестации фиксировали в 10% формалине, готовили гистологические срезы для иммунохимического пероксидазного окрашивания с применением моноклональных антител к TLR4 (1:200; Termofisherscientific). Продукт реакции визуализировался в виде коричневого окрашивания.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** На стадии 9 нед. гестации экспрессия TLR4 была локализована практически во всей сетчатке от центра до периферии и от внутренней пограничной мембраны до наружной пограничной мембраны. Экспрессия TLR4 была отмечена и в других структурах глаза. В сетчатке, а также в мезенхиме, окружающей глаз, встречались митотические клетки, экспрессирующие TLR4. На 15 нед. в сетчатке окрашивание было локализовано преимущественно в слое ганглиозных клеток, слое нервных волокон и в формирующемся внутреннем плексиформном слое. Этот период в развитии глаза характеризуется активным ростом сосудов собственно сетчатки и дальнейшим формированием слоя ганглиозных клеток и ростом их аксонов.

**ВЫВОД.** Учитывая, что в пренатальном развитии риск попадания инфекции в глаз минимален, можно сделать предположение о том, что экспрессия TLR4 необходима для внутриутробного развития органов и тканей плода, в том числе и глаза. Это позволило нам высказать гипотезу, что проявление реакции сходной с «воспалением» в развитии глаза является физиологическим процессом, который опосредует дифференцировку и пролиферацию клеток, не связанную с инфекционным фактором. Таким образом,

экспрессия TLR4-рецепторов в сетчатке в раннем пренатальном развитии человека может быть связана с регуляцией пролиферативного и дифференцировочного потенциала.

Финансирование исследования: *Работа проведена в рамках темы Государственной программы № ИС ГЗ 0108-2016-0005 «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка».*

**Панова И.Г.<sup>1</sup>, Низяева Н.В.<sup>2</sup>, Иванец Т.Ю.<sup>2</sup>, Беззубенко Ю.В.<sup>2</sup>, Синицына В.А.<sup>2</sup>, Полтавцева Р.А.<sup>2</sup>, Татиолов А.С.<sup>3</sup>, Строева О.Г.<sup>1</sup>, Щеголев А.И.<sup>2</sup>, Сухих Г.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН  
pinag@mail.ru

**АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА**

Альфа-фетопротеин (АФП) — белок сыворотки крови в пренатальном развитии человека. АФП синтезируется эндодермой желточного мешка и фетальной печенью. После синтеза АФП поступает в циркуляторное русло плода и переносится к его органам и тканям, а также диффундирует в материнскую кровь. В литературе имеются следующие гипотезы функционального значения АФП в пренатальном развитии плода: 1) он обладает иммуносупрессивными свойствами, что обеспечивает защиту плода от иммунной материнской реакции, 2) он является белком-переносчиком и, обладая высоким сродством к ПНЖК, доставляет их к развивающимся клеткам, 3) АФП участвует в половой дифференцировке мозга. В глазу у некоторых позвоночных животных была показана локализация АФП в ганглиозном слое сетчатки. Однако в пренатальном развитии глаза человека АФП не исследовали.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать АФП в тканях глаза человека в пренатальном развитии и проанализировать его значение для развития глаза.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Объекты исследования — сетчатка, хрусталик и стекловидное тело, полученные от плодов человека с 9 по 31 нед., взятые на аутопсии по медицинским показаниям. Применяли биохимические, иммуногистохимические методы исследования и ПЦР-анализ. Контролем служила фетальная печень.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Биохимический анализ показал высокую концентрацию АФП в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаз плодов человека между 14 и 23 нед. В этот период, несмотря на большой разброс между индивидуальными значениями (0.13–17.39 мг/мл), в стекловидном теле преобладает высокая концентрация АФП, с максимальным значением 17.39 мг/мл на 17 нед. На 24 нед. концентрация АФП снижается, достигая 0.18–1.4 мг/мл, и продолжает снижаться до минимального значения 0.006 мг/мл на 31 нед. В сетчатке и хрусталике концентрация АФП на 1 или 2 порядка ниже, чем в стекловидном теле, но при этом имеет высокие

значения до 24 нед. Наблюдающееся снижение концентрации АФП в тканях глаза согласуется с известной тенденцией уменьшения концентрации этого белка в общей циркуляции крови плода с возрастом. Иммуногистохимически выявлена локализация этого белка в исследованных тканях, что согласуется с биохимическими данными. Результаты ПЦР-анализа показали, что мРНК к АФП детектируется в печени (контроль), но не обнаруживается в сетчатке и хрусталике. Это свидетельствует о том, что АФП в процессе развития не синтезируется клетками сетчатки и хрусталика, а захватывается ими извне.

**ВЫВОД.** Такие свойства АФП, как способность переноса биологически активных молекул к развивающимся тканям, высокое сродство к ПНЖК, важная роль в ряде клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, иммуносупрессивные свойства, антиоксидантные свойства, участие в создании онкотического давления и др. свидетельствуют о важной роли АФП в раннем пренатальном развитии глаза человека.

Финансирование исследования: *Работа проведена в рамках Государственной программы № ИС ГЗ 0108-2016-0005 «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка» и частично поддержана грантом РФФИ № 16-03-00735.*

**Свешникова А.Н.<sup>1</sup>, Нечипуренко Д.Ю.<sup>1</sup>, Обыденный С.И.<sup>1</sup>, Пантелеев М.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН  
mapanteleev@yandex.ru

### **ЗАПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТочНАЯ СМЕРТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АКТИВАЦИИ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И (ПАТО) ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Один из наиболее интригующих феноменов последних лет в области клеточной биологии крови — формирование прокоагулянтной субпопуляции при активации тромбоцитов тромбином или коллагеном. Эти клетки могут ускорять реакции свертывания крови на своей поверхности, но не способны к полноценной агрегации. Как сейчас становится понятно, они формируются в результате запрограммированной клеточной смерти по некротическому механизму, обусловленному перегрузкой митохондрий кальцием. В процессе артериального тромбообразования уникальные свойства этой субпопуляции оказываются важными для регуляции стабильности и размера тромба. При патологических ситуациях (синдром Казабаха — Меррит, синдром Вискотта — Олдрича) этот механизм может приводить к системной активации тромбоцитов, их быстрому клиренсу и тромбоцитопении. Здесь мы представим наши последние результаты, связанные с механизмами внутриклеточной сигнализации, регулирующими формирование прокоагулянтных тромбоцитов при физиологической стимуляции через основные рецепторы P2Y1, P2Y12, PAR1, PAR4, а также с управлением балансом между «нормальной» активацией и «сверхактивацией», индуцирующей запрограммированный некроз.

Финансирование исследования: *Гранты РФФИ 17-04-01309, 15-34-70009, 16-04-01163, 16-04-00125, 16-34-01342, 17-54-04009, гранты Пре-*

*зидента РФ МД-229.2017.4, МК-5879.2016.4, МК-2706.2017.4*

**Парчайкина М.В., Ревин В.В.**

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

mary.isakina@yandex.ru

### **ВЛИЯНИЕ ГИАЛУРОНАТА КАЛИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ КРЫСЫ**

Проблема восстановления функций поврежденных периферических нервов до настоящего времени сохраняет свою актуальность в связи с недостаточной эффективностью различных подходов и методов их лечения [1]. Весьма перспективным направлением для посттравматической регенерации нервных проводников является использование биологически активных веществ, в частности, гиалуроновой кислоты [2, 3]. Нами исследованы активность фосфолипазы А2, липидный состав и состояние мембран седалищного нерва крысы после экспериментального повреждения через 12 ч., 1, 3, 7 и 30 сут. посттравматического периода, а также при травме на фоне нанесения в область повреждения в посттравматическом периоде гиалуроната калия в дозах 2, 17 и 30 мг/кг. Методами одномерной и газовой хроматографии, а также денситометрии было установлено, что повреждение нерва сопровождается увеличением содержания лизофосфолипидов и возрастанием активности как Ca<sup>2+</sup> — зависимой, так и Ca<sup>2+</sup> — независимой фосфолипазы А2. Введение препарата усиливает регенерационные процессы в поврежденном нерве, что выражается в восстановлении упорядоченности мембран нервного волокна, а также снижении содержания лизофосфолипидов и уменьшении активности Ca<sup>2+</sup> — зависимой фосфолипазы А2. Однако, использование гиалуроната калия не приводит к изменению активности Ca<sup>2+</sup> — независимой фосфолипазы А2, что, вероятнее всего, указывает на то, что она не участвует в механизме регенерации нервной ткани. Таким образом, можно предположить, что ускорение регенерационных процессов в поврежденном нервном проводнике при действии гиалуроната калия, по всей видимости, опосредовано функционированием Ca<sup>2+</sup>-зависимой фосфолипазы А2.

*Литература:*

1. Grinsell D., Keating C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies // *BioMed research international*. — 2014. — Vol. 2014. — P.698256.

2. Isakina M.V., Revina N.V., Revin V.V. Influence of potassium hyaluronate on the content of lysophospholipids and free fatty acids in damaged somatic nerves of rat // *Biology and Medicine*. — 2015. — Vol. 7, № 2. — P. 1–4.

3. Revin V.V., Isakina M.V., Pinyaev S.I., Revina N.V., Morozova A.A. Influence of potassium hyaluronate on the change of phospholipase activity and state of the membranes of damaged somatic nerves of rats // *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. — 2015. — Vol. 6, № 4. — P. 512–520



**Пахомов А.В., Божок Г.А.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины  
aleksandr.pakhomov2017@gmail.com*

**ИЗМЕНЕНИЕ ИММУННОЙ  
ПРИВИЛЕГИРОВАННОСТИ СЕМЕННИКА  
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ  
МЕТАЛЛОВ**

Одной из важнейших задач трансплантологии органов, тканей и клеток является продление существования донорского материала в организме реципиента. Трансплантация в определенные органы реципиента способна продлить существование трансплантата. Одним из таких органов является семенник, привилегированность которого поддерживается через ослабление врожденного и приобретенного иммунитета. Существует несколько факторов, которые вносят свой вклад в иммунную привилегированность семенников: снижение миграции дендритных клеток в лимфатические узлы и селезенку, присутствие гематотканевых барьеров, продукция противовоспалительных цитокинов (TGF- $\beta$ ), локальная экспрессия молекул, индуцирующих смерть лимфоцитов (Fas-лиганд), наличие особой популяции Т-хелперов, которые регулируют процессы иммунологической толерантности и обладают мощным иммуносупрессивным действием. Известно, что соли тяжелых металлов (кадмий, свинец, ртуть) могут повреждать органы посредством различных механизмов. Семенники животных особенно подвержены действию солей тяжелых металлов. Нашей задачей было исследовать способность семенника продлевать существование трансплантатов после нарушения целостности этого органа, вызванного хлоридом кадмия. Реципиентами были 3–4-месячные мыши линии Balb/c, а донорами новорожденные мыши возрастом до 36 ч. Орган для трансплантации – семенник новорожденной мыши, место трансплантации – семенник взрослого животного (группа 1). Для получения животных с поврежденным семенником (группа 2) водный раствор 0.1% хлорида кадмия вводился животным интраперитонеально за 4 нед. до трансплантации. Эксперименты проведены с использованием общей кетамин-ксилазиновой анестезии. Через месяц после трансплантации клетки интерстиция семенника были исследованы с помощью метода поточной цитофлуориметрии и клеточных маркеров: CD11b, Ly6g, CD3, CD45, CD4, CD8 (Abcam, UK). Данные по количеству клеток представлены как относительное количество меченых клеток к общему количеству клеток интерстиция, которое получали при помощи ферментативной обработки семенника. Для группы 2 (с трансплантацией, с инъекцией хлорида кадмия) было характерным стремительное возрастание относительного количества CD45+ клеток (лейкоцитов) до 55% от общего количества клеток, тогда как в контроле (без трансплантаций, без инъекции кадмия) только 4%, а в группе 1 (с трансплантацией, без инъекции кадмия) – 14%. Это возрастание происходило на фоне увеличения содержания CD11b+ и Ly6g+ клеток (макрофагов и нейтрофилов). Содержание, CD8+ и CD4+ клеток группы 2 также возрастало на порядок при сравнении с контрольными животными и группой 1. Сохранность трансплантата при этом в группе 1 была значительно выше, поскольку очаги воспаления и некроза были значительно меньше у группы 1. Вывод: нарушение структуры

органа, вызванное хлоридом кадмия, стимулировало накопление провоспалительных клеток в месте трансплантации и негативно сказывалось на способности семенника пролонгировать выживание трансплантата.

**Пахомова А.В.<sup>1</sup>, Першина О.В.<sup>1</sup>,  
Ермолаева Л.А.<sup>1</sup>, Ермакова Н.Н.<sup>1</sup>,  
Рыбалкина О.Ю.<sup>1</sup>, Крупин В.А.<sup>1</sup>, Пан Э.С.<sup>1</sup>,  
Небольсин В.Е.<sup>2</sup>, Скурихин Е.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН  
<sup>2</sup> ООО «ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ»  
angelinapakhomova2011@gmail.com

**ПОИСК НОВЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ  
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ  
РЕГЕНЕРАЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
И СЕМЕННИКОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ  
НАРУШЕНИЯХ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Метаболический синдром (МС) характеризуется абдоминальным ожирением, нарушениями гомеостаза и метаболизма глюкозы, дислипидемией и артериальной гипертензией. Осложнением МС являются диабет 2 типа, атеросклероз, артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца. У 15% мужчин с МС старше 40 лет диагностирован гипогонадизм. Терапия базируется на восполнении дефицита тестостерона. Гормонотерапия уменьшает симптомы андрогенной недостаточности, не восстанавливает структуру и функцию клеток, образующих ткань яичек. Основой регенерации тканей взрослого организма выступают постнатальные костномозговые и тканеспецифичные стволовые клетки (СК) и прогениторные клетки. Однако при МС стволовые клетки мало изучены.

**ЦЕЛЬ.** Изучить регенеративный потенциал стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Метаболические нарушения (МН) моделировали стрептозотоцином и жировой диетой у мышей самцов линии C57BL/6. Исследовали гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), прогениторные гемопоэтические клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (ММСК) и предшественники клеток стромы, предшественники инсулин продуцирующих  $\beta$ -клеток, прогениторные эндотелиальные клетки и предшественники гемангиогенеза, прогениторные эпителиальные клетки, сперматогонимальные стволовые клетки (ССК). Магнитной сепарацией СК выделяли из крови, поджелудочной железы и семенников. Цитометрическими методами исследовали поверхностные антигены, методами культуры и в трансплантационном тесте изучали регенераторный потенциал СК и прогениторных клеток. Морфологическими методами оценивали морфопатологические изменения в ткани поджелудочной железы и семенников. В иммуногистохимических исследованиях изучалась экспрессия инсулина, маркеров клеток воспаления, эндотелиальных и эпителиальных клеток. Биохимическими методами и ИФА в биологических образцах оценивали липидный спектр, глюкозу, медиаторы воспаления, тестостерон и глюкозозависимый инсулинотропный полипептид. Дополнительно оценивалась фертильность животных.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлены: воспалительный эффект костномозговых ГСК и прогениторных гемопоэтических клеток (паракринный механизм), стимуляция эндотелиальных прогениторных клеток, предшественников клеток стромы и ММСК в семенниках, высокий регенеративный потенциал панкреатических предшественников гемангиогенеза и продуцирующих инсулин  $\beta$ -клеток, ССК мышей самцов линии C57BL/6 при МН. Изученные клетки являются потенциальными мишенями для избирательной противовоспалительной терапии, стимуляции регенерации стромы и микроциркуляторной сети, восстановления популяции продуцирующих инсулин  $\beta$ -клеток. Низкие темпы регенерации островковых клеток и тканей семенников при метаболических нарушениях связаны с ингибирующим действием диабетических факторов

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках НИР НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (Томск) при финансовой поддержке ООО «ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ» (Москва).*

**Пеньков Д.Н., Егоров А.Д., Ткачук В.А.**

МГУ им. М.В. Ломоносова  
dpenkov@yahoo.com

#### **РОЛЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ PRRP1 В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В АДИПОЦИТЫ**

Задача получения жировых клеток *in vitro* является ключевой для решения многих проблем регенеративной медицины. Зрелые адипоциты в живом организме образуются из мезенхимальных стромальных клеток (МСК) под действием сигнальных каскадов и транскрипционных факторов. *In vitro* адипогенная дифференцировка МСК или преадипоцитов может стимулироваться различными индукторами, необходимыми для активации сигнальных путей и ремоделирования хроматина. Для этого процесса необходимы транскрипционные факторы, многие из которых являются важнейшими регуляторами адипогенеза. Наши исследования посвящены гомеодомен-содержащим транскрипционным факторам. Нами было показано, что фактор транскрипции Prrp1 является репрессором адипогенной дифференцировки. При его пониженной экспрессии как в мезенхимальных стромальных клетках (МСК), так и в клеточной линии 3T3-L1, значительно увеличивается потенциал адипогенной дифференцировки. Установлено, что Prrp1 действует на этапе перед дифференцировкой, так как снижение его уровня вызывает экспрессию адипоцит-специфических генов даже в отсутствие адипогенных индукторов. Клетки с низким уровнем экспрессии Prrp1 характеризуются повышенной способностью фактора C/EBP $\beta$  связываться с ДНК, при этом ни его экспрессия ни фосфорилирование не изменяется. Таким образом, мы заключили, что действие Prrp1 состоит в препятствовании избыточному связыванию транскрипционных факторов с ДНК, в частности, такого важного при адипогенезе, как C/EBP $\beta$ .

Финансирование исследования: *Грант Российского научного фонда (проект № 14-35-00026) «Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: выяснение молекулярных механизмов, ключевых сигнальных путей и транскрипционных факторов*

*с целью определения биомисшеней для новых лекарственных средств».*

**Перепелина К.И., Дмитриева Р.И., Малашичева А.Б.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России  
kseniya.perepelia@mail.ru

#### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАМИНА А/С С СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ NOTCH И WNT ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК**

Ламины А/С являются основными структурными белками ядерной оболочки клетки и в то же время играют существенную роль в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Мутации в гене LMNA, кодирующем ламину А/С, ассоциированы с ламинопатиями — тяжелыми наследственными заболеваниями с поражением тканей преимущественно мезенхимного происхождения — жировой, костной, мышечной. Развитие ламинопатий связывают с нарушением процесса дифференцировки стволовых клеток. Точные механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, изучены слабо. Сигнальные пути Notch и Wnt являются одними из основных, определяющих дифференцировочные решения клеток. Целью исследования было проверить гипотезу о взаимодействии ламинов А/С с сигнальными путями Notch и Wnt и оценить роль этого взаимодействия в опосредовании клеточной дифференцировки. В работе использовали мезенхимные стволовые клетки, происходящие из ткани миокарда; исследовали эффект замены R482L в гене LMNA (связана с нарушением образования жировой ткани) и замены R527C (вызывает нарушение образования костной ткани). Активацию сигнального пути Notch осуществляли с помощью введения в клетки активированного домена белка Notch — NICD. Активацию сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин осуществляли путём введения в клетки стабилизированного  $\beta$ -катенина на лентивирусном носителе. В клетках индуцировали адипогенную, либо остеогенную дифференцировку, после чего оценивали влияние мутантных форм ламина, также вносимых на лентивирусном носителе, на процесс дифференцировки. Активацию экспрессии специфических генов дифференцировки оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для морфологического анализа дифференцированные клетки окрашивали с помощью специфических красителей. Точечные мутации в гене LMNA приводили к изменению активности сигнальных путей Notch и Wnt/ $\beta$ -катенин на уровне экспрессии генов-мишеней HEY1 и AXIN, соответственно, а также снижали способность стволовых клеток к адипогенной и остеогенной дифференцировке. Таким образом, ламины А/С модулируют активность сигнальных путей Notch и Wnt и способны таким образом оказывать влияние на дифференцировку стволовых клеток.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РНФ 16-15-10178.*

**Петинати Н.А., Дризе Н.И., Рисинская Н.В., Судариков А.Б., Фирсова М.В., Попова Н.Н., Дубняк Д.С., Королева О.М., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.**

ФГБУ «Гематологический научный центр»  
Минздрава России  
loel@mail.ru

**ВНУТРИКОСТНОЕ ВВЕДЕНИЕ  
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫМ С  
НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТЬЮ ТРАНСПЛАНТАТА  
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК:  
АНАЛИЗ ПРИЖИВЛЕНИЯ И ПОСЛЕДУЮЩЕЕ  
ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВЕТВОРЕНИЯ**

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) участвуют в формировании ниш для стволовых кроветворных клеток и являются элементами, поддерживающими кроветворение. Выявляют несколько причин несостоятельности или отторжения трансплантата (НТ) у больных после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Одним из факторов может быть повреждение кроветворного микроокружения, за счет воздействия химиотерапевтических препаратов и опухолевых клеток. В результате строма костного мозга (КМ) теряет способность поддерживать кроветворение. Возможно МСК донора могут в этих случаях служить источником восстановления ниш для кроветворных клеток. В ФГБУ ГНЦ Минздрава России проводится исследование по использованию МСК для профилактики и лечения острой реакции трансплантат против хозяина. При этом для каждого больного индивидуально наращиваются МСК от собственного донора КМ, которые хранятся в замороженном виде. Наблюдались 4 больных с НТ после алло-ТГСК. Во всех 4 случаях была предпринята попытка повторной алло-ТГСК с введением МСК от донора КМ. МСК вводилась в гребни подвздошных костей. Для введения МСК размораживали и суспендировали в 2 мл 6% полиглюкина. Клетки ( $200-370 \times 10^6$ ) вводили в ткань кости маленькими порциями по 100–200 мкл через 2 прокола на коже и множественные проколы надкостницы. Во всех 4 случаях после внутрикостного введения МСК и повторной алло-ТГСК от того же донора у больных отмечалось восстановление донорского кроветворения. У больных через 1, 2 и 4,5 мес. после внутрикостного введения донорских МСК были выполнены пункции КМ. Забирали по 2–3 мл КМ из 2–4-х независимых проколов задних остей подвздошных костей у каждого больного. Из забранного КМ выделяли и культивировали МСК по стандартному протоколу. На 1–3-м пассажах из МСК больных выделяли ДНК и определяли химеризм с помощью метода STR-PCR. В таблице представлены данные по химеризму в КМ и исследованных МСК у больных.

**Таблица**

Время после введения МСК внутрикостно, мес.	Пациенты	Пропорция донорских клеток, %				
		1	2	4,5		
	КМ	МСК	КМ	МСК	КМ	МСК
1М	25–50	6,9±0,5	100	нд	100	9,3±0,4
2П	100	нд (нет данных)	100	5,0±0,09	нд	нд
3Ф	100	3,1±0,002	100	нд	нд	нд
4Х	100	2,0±0,8	нд	нд	100	

Показано, что введенные в небольшом количестве МСК остаются локализованными в месте введения и не теряют способности пролиферировать *ex vivo*. Фактически эти клетки пережили 3 переноса: из организма донора в культуру, затем снова в организм больного и повторно в культуру. Пропорция донорских клеток среди МСК больных была невелика, они выявлялись не во всех образцах полученного КМ. Это может быть связано с тем, что место забора КМ не совпало с местом введения МСК, или с тем, что МСК были введены в небольшом количестве. МСК стали причиной восстановления донорского гемопоэза, вероятно они выполнили трофическую функцию и, возможно, участвовали в восстановлении ниш для кроветворных клеток. Таким образом, во-первых, впервые показано длительное существование МСК донора в организме человека. Во-вторых, выявлены большие потенции МСК к повторным переносам.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00102).*

**Петренко А.Е.<sup>1,2</sup>, Белгородцев С.Н.<sup>2</sup>, Филимонов П.Н.<sup>2</sup>, Чередниченко А.Г.<sup>2</sup>, Шварц Я.Ш.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup> ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России  
tonya.petrenko1997@gmail.com

**АПОПТОТИЧЕСКИЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ,  
ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, СПОСОБНЫ  
ОКАЗЫВАТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ  
ПРИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ  
У МЫШЕЙ**

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) нашли самое широкое применение в регенеративной медицине, тогда как в лечении инфекционных заболеваний клеточная терапия практически не применяется. Одной из причин редкого использования этих клеток в данной области являются представления о преимущественно иммуносупрессивном действии МСК. Между тем, функциональный фенотип МСК способен как к про-, так и к противовоспалительной поляризации. В настоящей работе исследовали влияние МСК с про- и с противовоспалительным фенотипом на развитие БЦЖ-инфекции у мышей линии BALB/c. Предполагается, что одним из механизмов терапевтического действия вводимых в организм МСК может быть массивный апоптоз этих клеток с генерацией большого количества апоптотических телец и апоптотических микровезикул (экзосом). Одновременно с эффектами МСК мы тестировали влияние указанных микрочастиц, полученных от МСК с про- или противовоспалительным фенотипом, на инфекционный процесс, вызванный микобактериями

*M. bovis* у мышей. МСК получали из костного мозга бедренных и большеберцовых костей животных по стандартной методике. В работе использовали третий пассаж клеток; тип клеток верифицировали по стандартным протоколам с использованием соответствующих CD-маркеров и дифференцировочных тестов. Для получения кондиционированных МСК с провоспалительным фенотипом в культуральную среду за 24 ч. до окончания культивирования добавлялся лиганд TLR3 в дозе 1 мкг/мл, фенотип идентифицировался по спектру продуцируемых цитокинов. Апоптотические тельца и эктосомы получали методом последовательного центрифугирования культуральной жидкости от апоптотирующих МСК; апоптоз был индуцирован под действием гипоксии в сочетании с депривацией сыворотки. МСК вводили внутривенно по 750 тыс. клеток/мышь через 11 нед. после инфицирования. Микрочастицы вводились животным в количестве, полученном из такого же числа клеток. Спустя 14 нед. после инфицирования забирали образцы тканей для последующего анализа. Было показано, что МСК, кондиционированные лигандом TLR3, достоверно ускоряют клиренс микобактерий у инфицированных мышей. Введение апоптотических телец и эктосом от этих же клеток оказывало еще более выраженный лечебный эффект. Некондиционированные МСК, напротив, ускоряли рост микобактерий. Очевидно, при соответствующем кондиционировании использование МСК и/или их дериватов может стать новым инструментом в терапии микобактериальных инфекций и других инфекционных заболеваний.

**Петрова Е.С.<sup>1</sup>, Исаева Е.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт экспериментальной минералогии» РАН

<sup>2</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России  
morphologija@yandex.ru

#### **ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ НАЛОЖЕНИЯ ЛИГАТУРЫ И ВВЕДЕНИЯ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ**

С помощью поведенческих тестов, физиологических методов исследования проводимости нервов, а также морфологически многими авторами показано, что клеточная терапия с применением стволовых клеток (МСК, НСК, индуцированных клеток и др.) оказывает стимулирующее влияние на восстановление поврежденных периферических нервных проводников. Наше предыдущее исследование показало, что введение в поврежденный нерв крысы диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга (СМ) приводит к увеличению числа миелинизированных нервных волокон в дистальном сегменте поврежденного нерва [Петрова, Исаева // Известия РАН. Серия биологическая, 2014]. Однако механизмы благоприятного влияния трансплантации нейральных клеток-предшественников на рост регенерирующих нервных волокон неясны. Цель настоящего исследования — изучение пролиферации шванновских клеток (ШК) нерва крысы-реципиента после его передавливания и субперинеурального введения диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга крысы. Работа выполнена на крысах Вистар

( $n = 15$ ). Донорами служили эмбрионы крыс E15, у которых выделяли закладку СМ, диссоциировали и аллотрансплантировали в предварительно поврежденный (лигатура 40 с) седалищный нерв взрослых животных. Для выявления пролиферирующих шванновских клеток (нейролеммоцитов) использовали моноклональные мышинные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA). Препараты докрашивали толуидиновым синим. ШК — глиальные элементы ПНС, выполняющие ряд важнейших функций и обеспечивающие микроокружение для регенерирующих аксонов поврежденного нерва. ШК составляют большинство клеточных элементов нерва. Они располагаются вдоль нервных волокон, ядра ШК имеют характерную вытянутую форму. По своей локализации и форме они отличаются от ядер эндотелиоцитов и фибробластов, которые составляют в нервном стволе менее 5%. Анализ препаратов показал, что в интактном нерве крысы ШК в состоянии пролиферации и митотического деления практически не встречаются. После травмирования в дистальном конце нервного ствола происходят изменения, характерные для валлеровской дегенерации: гибель аксонов, распад миелиновых оболочек, увеличение числа макрофагов. Через 30 сут. выраженность этих процессов снижается, и в дистальном сегменте нерва уже наблюдаются тонкие регенерирующие нервные волокна. Проллиферация ШК после травмы нерва достигает пика в первые несколько суток, в дальнейшем она постепенно снижается. По нашим данным через 30 сут. после операции она составляет менее семи промилле. Установлено, что при введении в поврежденный нервный ствол диссоциированных клеток эмбрионального СМ, через 30 сут. после операции число PCNA+ ШК увеличивается приблизительно в полтора раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что пересаженные нейральные клетки-предшественники, являющиеся источником многих ростовых и трофических факторов, могут влиять на пролиферацию и функциональную активность эндогенных ШК, способствуя тем самым росту регенерирующих нервных волокон реципиента.

**Плотников Е.Ю.<sup>1</sup>, Бабенко В.А.<sup>1</sup>, Силачев Д.Н.<sup>1</sup>, Певзнер И.Б.<sup>1</sup>, Зорова Л.Д.<sup>1</sup>, Сухих Г.Т.<sup>2</sup>, Зоров Д.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова  
plotnikov@belozersky.msu.ru

#### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Известно, что стволовые клетки активно обмениваются сигналами с окружающей тканью, особенно если речь идет о мультипотентных стромальных клетках (МСК), а в 2006 г. была открыта возможность межклеточного транспорта митохондрий. Поскольку большое число заболеваний связано с нарушением митохондриальных функций, очень привлекательной становится возможность замены неправильно функционирующих митохондрий здоровыми органеллами

донорских клеток. В данной работе мы исследовали восстановление митохондриальных функций при транспорте митохондрий из МСК в астроциты и нейроны головного мозга, а также нейроно-подобные клетки PC12. Проанализирована эффективность межклеточной передачи митохондрий при индукции повреждения митохондрий, а также при повышении экспрессии белка Miro1, отвечающего за транспорт митохондрий. Мы показали, что при сокультивировании МСК с нейронами или астроцитами митохондрии из МСК передаются в нейроны/астроциты, тогда как обратного транспорта не наблюдается. При сокультивировании МСК, сверхэкспрессирующих белок Miro1, с астроцитами мы выявили увеличение числа клеток, получивших митохондрии от МСК. Если культура астроцитов перенесла ишемию, то процент астроцитов, получивших митохондрии от стволовых клеток также значительно возрастал. Еще одним доказательством стимуляции передачи митохондрий при их повреждении стало использование ро-нулевых клеток PC12, в которых отсутствует или повреждена митохондриальная ДНК. Сокультивирование таких клеток с МСК также вызывало значительный прирост доли клеток, получивших митохондрии из МСК. Клетки PC12 с поврежденной митохондриальной ДНК из-за нарушенного дыхания основную часть энергии получают путем гликолиза, в результате чего увеличивается продукция лактата. После сокультивирования с МСК количество лактата в среде снижалось, что говорит о восстановлении процессов окислительного фосфорилирования. В случае введения МСК крысам, перенесшим ишемию головного мозга, неврологический дефицит снижался к 14 дню наблюдения, но более выраженный эффект наблюдался при введении крысам МСК, сверхэкспрессирующих белок Miro1. Таким образом, донорство митохондрий играет ведущую роль в нейропротекторных эффектах МСК, причем этот транспорт усиливается при повреждении митохондрий в нейральных клетках. Генетическая модификация МСК, увеличивающая в них количество белка Miro1, усиливает передачу митохондрий и повышает нейропротекторную эффективность таких клеток.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (грант 17-04-01045) и РНФ (грант 14-15-00107).*

**Подольяк Е.Я., Кедров А.В.**

Московский физико-технический институт  
podolyak@phystech.edu

### **ВЛИЯНИЕ МЕМАНТИНА НА ГИППОКАМПАЛЬНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ У ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ**

Впервые наличие нейрогенеза во взрослом мозге человека было показано в конце 1990-х гг.. Обнаружилось, что возникновение новых нейронов в зрелом гиппокампе может быть необходимо для обучения, памяти и регуляции эмоционального поведения. В ряде работ было показано, что облучение животных, включая человека, терапевтическими дозами радиации, например, использующимися при лечении онкологических заболеваний, губительно сказывается на процессе взрослого нейрогенеза. Наблюдаются изменения в делении и дифференцировке нейральных стволовых клеток в зрелом гиппокампе, и, как следствие, снижаются когнитив-

ные способности индивида. Таким образом, остро встает проблема компенсации нейрогенеза (усиления пролиферации нейральных стволовых клеток и увеличения количества новообразованных нейронов). Для восстановления когнитивных функций при многих неврологических расстройствах, таких как деменция, болезни Альцгеймера и Паркинсона, нередко используют мемантин — антагонист NMDA — рецепторов, у которого также были выявлены про-нейрогенные эффекты. В нескольких работах было показано способность этого препарата стимулировать деление нейральных стволовых клеток. Через 3–6 нед. после инъекций мемантина наблюдалось улучшение гиппокамп-зависимой памяти, что положительно коррелирует с числом новообразованных нейронов. Поэтому, во-первых, изучение влияния мемантина на прогениторные клетки позволит более широко понять механизмы и методы восстановления нейрогенеза — процесса, столь важного для гиппокампа — зависимых функций мозга. Во-вторых, вопреки использованию мемантина при деменциях, он может оказаться эффективным и для компенсации когнитивных нарушений, связанных с воздействием радиации на мозг и гиппокамп, в частности. Данная работа посвящена изучению влияния мемантина на гиппокампальный нейрогенез у взрослых животных после облучения. В ходе работы было показано, что и облучение, и воздействие мемантина способны снижать количество покоящихся нейральных стволовых клеток (QNPCs) на длительном промежутке времени. Кроме того, спустя месяц после облучения всё еще наблюдается снижение уровня пролиферации QNPCs в результате воздействия радиации. Столь длительный эффект облучения объясняется исключительной уязвимостью QNPCs, оказавшихся гораздо более чувствительными к радиации, чем любая другая субпопуляция в зубчатой извилине гиппокампа. Негативное влияние мемантина объясняется способностью препарата усиливать нейрогенез путем истощения пула стволовых клеток. Поскольку данная популяция не является возобновляемой, снижение количества QNPCs в длительной перспективе может привести к существенному снижению количества новых нейронов в гиппокампе и, как следствие, ухудшению когнитивных функций. Среди прочих анализируемых параметров для оценки предполагаемого краткосрочного положительного воздействия мемантина на нейрогенез был проведен подсчет новорожденных нейронов, предшественники которых находились на стадии клеточного деления через неделю после облучения. Представленная информация позволяет сделать вывод о том, что в длительной перспективе мемантин оказывается не способен компенсировать снижение уровня нейрогенеза, произошедшего в результате облучения. Краткосрочное положительное воздействие мемантина может привести к долгосрочным пагубным эффектам, что необходимо учитывать при назначении мемантина различным категориям пациентов.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ.*

**Полешко А.Г., Василевич И.Б.,  
Волотовский И.Д.**

ГНУ «Институт биофизики и клеточной  
инженерии НАН Беларуси»  
Renovacio888@yandex.ru

**ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ  
КИСЛОРОДА НА ПРОЦЕСС СПОНТАННОЙ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК В КУЛЬТУРЕ**

Подбор условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) *in vitro* для получения необходимого объема клеточной биомассы путем пассирования, при которых клетки смогут реализовать свой пролиферативный потенциал, сохранив при этом высокую жизнеспособность и мультипотентность, что определяет их пригодность для применения в регенеративной медицине и клеточной терапии, крайне актуален. Как известно, использование физиологически низких концентраций  $O_2$  при культивировании является оправданной стратегией для экспрессивного наращивания биомассы МСК, т.к. способствует повышению пролиферативной активности и жизнеспособности клеток с сохранением дифференцировочного потенциала. Вместе с тем, явление спонтанной дифференцировки МСК при различных условиях культивирования и молекулярные механизмы данного процесса остаются мало изученными. Целью настоящей работы явилось изучение влияния гипоксии (5%  $O_2$ ) на спонтанную дифференцировку МСК жировой ткани (ЖТ) в остеогенном и хондрогенном направлениях. МСК ЖТ культивировали в стандартных условиях (5%  $CO_2$ , 95% атмосферного воздуха) до 2 пассажа в среде  $\alpha$ -MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). В экспериментах использовали клетки с типичным для МСК фенотипом CD73+/CD90+/CD105+/CD45-/CD34-. На 3 пассаже МСК переводили в гипоксические условия (5%  $CO_2$ , 5%  $O_2$ , 90%  $N_2$ ) и культивировали в монослое в среде  $\alpha$ -MEM с 2% ФБС без добавления специфических индукторов в течение 14 сут. Смену среды проводили каждые 3 сут. Экспрессию генов маркеров предшественников остеоцитов (щелочная фосфатаза, остеоопонтин, остеокальцин) и хондроцитов (коллаген 1, 2, 9, 10 типов, Sox9, агрекан), а также генов белков p53 и c-Myc проводили с использованием ПЦР в реальном времени. Обнаружено, что при культивировании МСК ЖТ в течение 14 сут. в условиях 5% содержания  $O_2$  экспрессия гена остеоопонтина в клетках не отличалась от таковой при 21%  $O_2$ , а экспрессия гена щелочной фосфатазы снижалась в 1,7 раза ( $p < 0,5$ ). Также установлено, что экспрессия гена такого важного для хондрогенной дифференцировки транскрипционного фактора как Sox9 и экспрессия гена компонента внеклеточного матрикса агрекана при гипоксии была ниже в 2 раза ( $p < 0,5$ ), чем при нормоксии. При этом уровень экспрессии коллагена 1 и 10 типов не имел статистически значимых различий. Экспрессия гена одного из поздних маркеров предшественников остеоцитов остеокальцина, а также генов коллагена 2 и 9 типов не была выявлена в МСК ЖТ ни при одном кислородном режиме культивирования. При изучении экспрессии генов транскрипционных факторов p53 и c-Myc, участвующих в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки, в МСК ЖТ, культивированных при 5%  $O_2$ , было выявлено ее снижение в 1,3 и в 2,7 раза, соответственно. Полученные данные дают основание полагать, что

культивирование МСК ЖТ в условиях 5% гипоксии снижает риск их спонтанной остео- и хондрогенной дифференцировки наряду с сохранением высокой пролиферативной активности и жизнеспособности.

**Полтавцева Р.А.<sup>1</sup>, Вторушина В.В.<sup>1</sup>,  
Свищевская Е.В.<sup>2</sup>, Романов Ю.А.<sup>1</sup>,  
Волгина Н.Е.<sup>1</sup>, Лупатов А.Ю.<sup>3</sup>, Кречетова Л.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии им. акад.  
В.И. Кулакова» Минздрава России

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН

<sup>3</sup> Институт биомедицинской химии  
им. В.Н. Ореховича  
rimpol@mail.ru

**ПРОФИЛЬ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ  
И ХЕМОКИНОВ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ  
МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ  
КЛЕТКАМИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ  
РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ**

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) обладают рядом терапевтических свойств, обусловленных продукцией широкого спектра биологически активных молекул. Терапевтическая эффективность ММСК может зависеть от типа ткани, из которой они получены. В связи с этим, необходимо определить спектр секретируемых молекул для ММСК, полученных из разных типов ткани. В данной работе методом цитометрических микрочастиц анализировали в среде культивирования наличие 40 цитокинов и хемокинов, спонтанно секретируемых ММСК, полученными из Вартонова студня (ВС), костного мозга (КМ), жировой ткани (ЖТ), пульпы молочного зуба (ПЗ), амниона (Ам), трофобласта (Тр), хориона (Хор), эндометрия (Энд), а также, для сравнения, фибробластами (Ф) и нейральных стволовыми/прогениторными клетками (НСПК). ММСК каждого типа получали от нескольких доноров ( $n = 3-6$ ) и тестировали на 2-4-м пассажах. Было зарегистрировано достоверное присутствие 10 из 40 факторов. Уровень продукции у ММСК от разных доноров различался в 2-12 раз, достоверных различий между пассажами не было. Максимальной была секреция интерлейкинов (ИЛ) 6 и 8, а также хемокинов CXCL 1 и 6 (11-160 мкг/мл). На основе профиля секреции, ММСК, полученные из различных источников, можно разделить на 3 группы: 1) низкопродуцирующие (фетальный и взрослый КМ, ЖТ, ПЗ, Ф и НСПК); 2) продуцирующие значительное количество ИЛ-8 и MIF (Энд и Ам) и 3) продуцирующие ИЛ-6, 8, MIF, CXCL1, 6 и CCL2 (ВС, Хор и Тр). Во 2-й и 3-й группах наблюдается корреляция по продукции всех факторов с  $p < 0,01$ . Все продуцируемые ММСК факторы относятся к провоспалительным. Наиболее выраженная активность была у ММСК 3-ей группы с убыванием в ряду ВС = Хор > Тр.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке РФФ № 14-25-00179.*

**Полуэктв Ю.М.<sup>1</sup>, Петрушканко И.Ю.<sup>1</sup>,  
Митькевич В.А.<sup>1</sup>, Лакунина В.А.<sup>1</sup>,  
Ундровинас Н.А.<sup>2</sup>, Ширинский В.П.<sup>2</sup>,  
Макаров А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
yuripoul@gmail.com

### **СОЕДИНЕНИЯ ТИОЛОВОГО РЯДА ПОДДЕРЖИВАЮТ СОКРАТИМОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**

Гипоксия миокарда является частым осложнением многочисленных патологических состояний — ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, операций на остановленном сердце, консервации изолированного сердца. В момент ишемии происходит гипоксическое повреждение клеток, связанное с тем, что в первые минуты начинается повышенное образование активных форм кислорода. Основным компонентом, определяющим редокс-статус клеток, является трипептид глутатион. Глутатион участвует в нейтрализации свободных радикалов. Присоединение глутатиона (глутатионилирование) защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления и модулирует их функцию. Нами было установлено, что соединения тиолового ряда: этилглутатион (et-GSH), окисленный глутатион (GSSG), N-ацетилцистеин (NAC), проникающий аналог окисленного глутатиона (tet-GSSG) и нитрозоглутатион (GSNO) увеличивают время нормальной сократимости клеток сердца в условиях гипоксии. Были установлены следующие эффективные действующие концентрации веществ: NAC — 10 мМ, et-GSH, GSSG, и tet-GSSG — 0.5 мМ, GSNO — 0.1 мМ. Инкубация с указанными концентрациями веществ приводит к тому, что период нормальной сократимости кардиомиоцитов в условиях гипоксии увеличивается в 4–5 раз по сравнению с контролем. В течение этого времени в клетках поддерживаются нормальные параметры Ca<sup>2+</sup> транспорта при стимуляции клеток прямоугольными импульсами электрического тока. Все исследованные вещества обладают низкой токсичностью. Увеличение концентрации веществ на порядок по сравнению с эффективными концентрациями практически не влияло на параметры жизнеспособности кардиомиоцитов. По совокупности параметров наибольшей эффективностью в плане защиты изолированных кардиомиоцитов крысы от гипоксии обладают GSNO, et-GSH и tet-GSSG. Защитное действие соединений тиолового ряда может быть обусловлено глутатионилированием ион-транспортирующих белков. В частности, для Na,K-АТФазы, поддерживающей гомеостаз ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, показано значительное возрастание степени глутатионилирования в клетках в присутствии GSNO и et-GSH. Таким образом, производные глутатиона могут быть использованы для защиты клеток миокарда от повреждения в условиях гипоксии.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-14-01152.*

**Помыткин И.А.**

*Первый Московский Государственный  
медицинский университет им. Сеченова  
ipomytkin@gmail.com*

### **МЕХАНИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ НЕЙРОНАЛЬНОГО ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И НЕЙРОНАЛЬНЫЙ ИНСУЛИН- СЕНСАЙЗЕР: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ИНСУЛИНОВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

Регенерация нервной ткани управляется нейротрофическими факторами путем активации рецепторных тирозинкиназ, в том числе инсулинового рецептора. Инсулиновый рецептор в ЦНС представлен короткой изоформой А (IR-A). В отличие от периферической изоформы В, IR-A активируется как инсулином, так и инсулиноподобным фактором роста 2 (IGF2), и участвует в стабилизации синапсов, росте нейритов и аксонов, и защите нейронов. Особую роль IR-A играет в регуляции взрослого нейрогенеза в ЦНС, где IGF2/IR-A сигнализация запускает пролиферацию клеток-предшественников нейронов и астроцитов. Мы обнаружили, что активация IR-A в нейронах находится под митохондриальным контролем. В ответ на инсулин, нейроны производят 15-с выброс перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), которая играет роль сигнала, разрешающего активацию IR-A. Рецептор активируется инсулином при условии, что выброс H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> достигает определенного порогового значения. Рецептор не активируется даже наивысшей дозой инсулина, если H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сигнал не достигает порогового значения. Ключевую роль в генерации сигнальной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> играет инсулин-стимулированное окисление сукцината. Митохондриальная сигнализация представляет собой новую терапевтическую мишень. Мы разработали дихолинсукцинат, средство улучшающее чувствительность инсулинового рецептора IR-A в нейронах/астроцитах. Дихолинсукцинат улучшает тиозинфосфорилирование IR-A в ответ на субоптимальные дозы инсулина. В то же время, дихолинсукцинат улучшает экспрессию IGF2, лиганда IR-A. Таким образом, дихолинсукцинат улучшает IGF2/IR-A сигнализацию в ЦНС. На экспериментальных моделях хронической церебральной гипоперфузии, эндотелин-1-индуцированного ишемического инсульта, хронического стресса, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, скополаминовой амнезии, черепно-мозговой травмы, и т.д. было показано, что этот нейрональный инсулин-сенсайзер улучшает взрослый нейрогенез в гиппокампе, достоверно улучшает обучение и память, проявляет анксиолитический и антидепрессивный эффект. Профиль фармакологической активности дихолинсукцината близок к таковому известному для IR-A в ЦНС. Лекарственная субстанция дихолинсукцината зарегистрирована в РФ. Первая фаза клинических испытаний показала безопасность лекарственного препарата. Идет подготовка к клиническим испытаниям, фаза II, с целью выявить эффективность препарата у лиц, перенесших ишемический инсульт в пост-инсультном периоде. В заключение, в ходе выполнения настоящей работы был открыт механизм митохондриального контроля активации нейронального инсулинового рецептора и разработан первый сенсайзер нейрональной изоформы инсулинового рецептора IR-A.

**Пономарёв И.В.**

*Research Centre of Medical Technology and Biotechnology, Bad Langensalza, Germany (fzmb GmbH)*

iponomarev@fzmb.de

**ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ТКАНЕ-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ (SCAFFOLD-FREE TECHNOLOGY)**

В настоящей работе представлен обзор результатов, полученных в процессе разработки и применения технологии изготовления трёхмерных ткане-инженерных эквивалентов без использования каких-либо матриц-носителей (scaffold-free technology). Тканевая инженерия, как одно из направлений регенеративной медицины, предполагает создание тканевых регенератов *ex vivo* с последующей их имплантацией в участок дефекта. Для поддержания трёхмерного фенотипа клеток в условиях *in vitro* используются, как правило, различные искусственные материалы — матрицы (MAST-technology). Разработанный нами метод позволяет создавать трёхмерные регенераты ткани без использования матриц-носителей. Первой целью разработки и практического применения данной технологии является нерегенерируемый в нативных условиях гиалиновый (суставной) хрящ. Основой создания хондрогенных конструкций при этом является применение мануальной механической (компрессионной) стимуляции вновь созданных клеточных агрегатов. Были развиты и апробированы основные принципы создания трёхмерных хрящевых конструкций из дифференцированных клеток, а также из недифференцированных клеток стромы костного мозга. При проведении сравнительных исследований между оригинальной методикой и MAST было выявлено 15-кратное превышение содержания основных компонентов хрящевого матрикса в конструкциях, изготовленных без применения матриц-носителей. Проведённые эксперименты на крупных животных (23 лошади, 50 овец) показали полную состоятельность разработанной технологии в лечении полнослойных повреждений гиалинового хряща. Дальнейшим этапом развития технологии стало создание *in vitro* модели для изучения механизмов остеоартроза. Данное направление было развито в связи с требованиями ЕС о снижении количества экспериментальных животных посредством использования клеточных *in vitro* моделей. Впоследствии, на основе принципов моделирования *in vitro*, был разработан метод создания остеогенных конструкций для изучения процессов начальной фазы репарации переломов костей. Реализация механизмов первичного остеогенеза в модели, привела к идее использовать данные конструкции при лечении сложных оскольчатых переломов костей. Первичные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности развития данного направления. Полученные положительные результаты инициировали расширение спектра применения данной технологии относительно других видов соединительной ткани. Так был проработан и подготовлен проект по исследованию морфогенеза и репаративных возможностей технологии для восстановления сухожильно-связочного аппарата при использовании различных типов клеток. Имеются первичные положительные

результаты по применению данной технологии в кардио-васкулярной области, где, например, созданы и охарактеризованы витальные прототипы створок сердечного клапана. Также был апробирован метод изготовления полых конструкций, имитирующих кровеносные сосуды для последующего их тестирования и изучения возможности создания данного вида регенератов. Вышеперечисленные практические результаты и перспективы разработок новых видов тканевых конструкций свидетельствуют о значительном научно-практическом потенциале технологии изготовления регенератов соединительной ткани без применения искусственных матриц-носителей.

**Пономарева Ю.В., Волова Л.Т., Сарбаева Н.Н., Милякова М.Н.**

*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России*  
jvponomareva@mail.ru

**ПОДХОДЫ К УСТАНОВЛЕНИЮ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНОГЕННОСТИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ МАТРИКСОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Результаты многочисленных исследований посвящены изучению различных способов децеллюляризации, очистки и стерилизации материала, варьированию тканевой реакции вследствие модификации коллагена различными химическими агентами для повышения его прочности. Как правило, широко исследуется ксеногенный материал, что не позволяет разграничить влияние факторов химической, физической обработки, изменяющих структуру экстрацеллюлярного матрикса или сохраняющих свое присутствие в субтоксических концентрациях и иммуногенность материала, обусловленную остаточным присутствием клеточных структур и белков. Цель исследования — оценить реакцию тканей при аллогенной и ксеногенной имплантации экстрацеллюлярного матрикса, полученного по идентичному протоколу детергентно-ферментного метода децеллюляризации. Получены лабораторные образцы экстрацеллюлярного матрикса детергентно-ферментным методом из кожи человека и крысы. Оценена его морфологическая структура, остаточное содержание ДНК, липидов, выполнен протеомный анализ методом электрофореза. Образцы имплантированы крысам в сформированные межфасциальные карманы задней поверхности шеи на срок 28, 45 и 90 сут. Проведен морфологический анализ эксплантированных образцов. По данным морфологического анализа во всех образцах экстрацеллюлярного матрикса была сохранена структура коллагеновых и эластических фибрилл. Содержание липидов в матриксе человека — 0,03%, крысы — 0,68% ; ДНК — 30 нг/мг, 202 нг/мг сухого веса соответственно. В децеллюляризованных образцах, так же, как и в нативных, отчетливо визуализировали фракции в зонах коллагенов ( $\alpha$ -цепи — 130 кДа, димеры — 260 кДа), а также фракции в зоне молекулярных масс более 80 кДа. При ксеногенной имплантации экстрацеллюлярного матрикса отмечена миграция моноцитов, их слияние с формированием гигантских клеток инородных тел. В отдаленные сроки — преобладание клеток фибробластического ряда и тучных клеток, что сопровождалось деградацией матрикса, замещением его собственной хорошо васкуляризованной соединительной тканью. Аллогенный материал,





сталлический  $\text{CeO}_2$  и материалы на его основе могут стать решением данной проблемы. Ранее показано, что наночастицы  $\text{CeO}_2$  стимулируют пролиферацию МСК человека и мыши, нормализуя клеточный метаболизм *in vitro*, в частности, редокс-статус клетки (Popov A., 2016). Скаффолды, модифицированные наночастицы  $\text{CeO}_2$ , обеспечивают лучшую клеточную адгезию и пролиферацию различных типов первичных клеточных культур (Naganuma, 2011). Полимерные композиции, включающие наночастицы  $\text{CeO}_2$ , способны ускорять заживление ран, модулируя раневой процесс и снимая воспаление. Между тем, существует ряд проблем, ограничивающих широкое применение в клинической практике. Одной из основной проблемой является отсутствие информации о долгосрочных эффектах влияния нанокристаллического  $\text{CeO}_2$  на организм модельных животных и нормативной базы по сертификации подобных соединений для клинического использования, что ограничивает развитие этого направления исследований. Также на сегодняшний день не существуют четкой классификации схем синтеза нанокристаллического диоксида церия, как материала для биомедицинского применения. Между тем анализ международных баз данных WoS и Scopus публикационной активности авторов в области исследования биологической активности наночастиц диоксида церия позволяет говорить об огромном интересе к данному соединению.

**Попов А.Л.<sup>1</sup>, Шекунова Т.О.<sup>2</sup>, Попова Н.Р.<sup>1</sup>, Иванов В.К.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова

antonpopovleonid@gmail.com

### **РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СКАФФОЛДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ $\text{CeO}_2$ , ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Разработка протоколов клинического использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека тесно связана с необходимостью совершенствования техники выделения и культивирования клеток. Между тем большинство предложенных на сегодняшний день способов размножения МСК, в частности использование бессывороточных сред и различных ростовых факторов, не обеспечивает достаточную эффективность их культивирования, а приводят лишь к значительному удорожанию процедур их клинического использования. Одним из способов ускорения пролиферации МСК является создание условий, максимально приближенных к условиям *in vivo*, в том числе путем оптимизации уровня оксигенации и условий микроокружения. Ранее нами была выявлена способность цитрат-стабилизированных наночастиц диоксида церия ( $\text{CeO}_2$ ) стимулировать пролиферацию первичных фибробластов мыши и мезенхимальных стволовых клеток человека в дозозависимой манере. Такое биологическое действие наночастиц  $\text{CeO}_2$  обусловлено их уникальной редокс-активностью и высокой степенью биосовместимости. Между тем возможность использования культуры МСК, стимулированных наночастицами, в клинической практике ограничивается отсутствием

информации о долгосрочных эффектах их влияния на организм. В связи с этим для возможности использования наночастиц  $\text{CeO}_2$  в клеточных технологиях существует необходимость минимизировать возможность их проникновения в клетку. В связи с этим разработка скаффолдов и покрытий для культивирования МСК человека, модифицированных наночастицами  $\text{CeO}_2$ , является одним из возможных путей решения данной задачи. В рамках данного исследования были изготовлены скаффолды путем нанесения золя наночастиц  $\text{CeO}_2$  с последующей сушкой при различных температурах. На модифицированные подложки высевались МСК человека, выделенные из пульпы зуба в концентрации 40 тыс./см<sup>2</sup> и проводили оценку адгезии, пролиферативной активности и жизнеспособности клеточной культуры. Все исследованные скаффолды поддерживали высокую степень адгезии МСК человека, при этом скаффолды с нанесенными цитрат-стабилизированными наночастицами  $\text{CeO}_2$  при температуре 60°C показали достоверное увеличение скорости пролиферации (на 35–40% по сравнению с контролем) и наименьшую долю нежизнеспособных клеток через 48 ч. культивирования по сравнению со скаффолдами с нанесенными цитрат-стабилизированными наночастицами  $\text{CeO}_2$  при температуре 450°C. Подобные результаты можно объяснить увеличением степени кристаллизации наночастиц  $\text{CeO}_2$  при высокой температуре и снижению доли  $\text{Ce}^{3+}$  на поверхности наночастиц. Таким образом, модификация поверхности наночастицами диоксида церия может обеспечить стимуляцию пролиферации МСК человека, при этом скорость можно контролировать варьирующие условия синтеза покрытия.

Финансирование исследования: грант РФФИ-Московская область № 17-44-500718 p\_a.

**Верецагина Н.А., Петров Н.С., Попов Б.В.**

ФГБУН «Институт цитологии РАН»

borisvp478@gmail.com

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕПРЕССОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ СЕМЕЙСТВА POU5O5B – PRC1 AND PRC2, В ХОДЕ ЖИРОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Цель настоящей работы заключалась в изучении роли взаимодействия репрессорных комплексов PRC1 и PRC2 в механизме жировой дифференцировки (ЖД) мышечных мезенхимных стволовых клеток (МСК) линии C3H10T1/2 (10T1/2). Путём стабильной экспрессии ретровирусного вектора shBMI1.puro мы получили культуру клеток 10T1/2, конститутивно продуцирующих высокий уровень Gfp и низкий уровень продукта гена BMI1. Используя указанные культуры, мы оценили в ходе индукции ЖД формирование адипоцитов, уровень экспрессии и продукции BMI1 and EZH2 – основных компонентов, соответственно, комплексов PRC1 и PRC2, и их взаимодействие с промоторами PPAR $\gamma$ 2 и RUNX2 – ключевых регуляторных генов жировой и костной дифференцировки. Мы показали, что репрессия BMI1 замедляла и снижала, но не отменяла ЖД. В недифференцированных клетках промоторы генов PPAR $\gamma$ 2 и RUNX2 аккумулировали высокий уровень белков Bmi1, Ezh2 и низкий уровень Utx, специфически деметилирующей H3K27me3 и формирующей вместе с Ezh2 эпигенетический переключатель, регу-

лирующий образование активного хроматина. В ходе ЖД взаимодействие *Bmi1*, *Ezh2* and *Utx* изменялось на противоположное с промотором гена *PPAR $\gamma$ 2*, но не изменялось с промотором гена *RUNX2*. Важно отметить, что продукт гена ретинобластомы (*pRb*) и его партнёр белок *p130* аккумуляровались в адипоцитах в ходе ЖД, однако, высокий уровень *p130* на промоторе *PPAR $\gamma$ 2* выявлялся в недифференцированных клетках, но снижался в ходе ЖД, что свидетельствует о супрессорной роли *p130* в регуляции экспрессии *PPAR $\gamma$ 2*. Наши результаты дают возможность предположить, что взаимодействие *PRC1* и *PRC2* необходимо для эффективной экспрессии основных регуляторных генов ЖД. Однако, фенотипически ЖД формируется с участием других факторов, которые могут компенсировать снижение уровня продукции *Bmi1* и *PPAR $\gamma$ 2*. Наши результаты также показывают, что в ходе ЖД в мышечных МСК происходит снижение уровня и активности *Ezh2*, что отличает их от МСК человека.

Финансирование исследования: гранты № 14-50-00068 РФФ и 16-04-00251 РФФИ.

**Попов Г.И.<sup>1</sup>, Попрядухин П.В.<sup>2</sup>, Вавилов В.Н.<sup>1</sup>, Юдин В.Е.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

<sup>2</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН [trek-4300@yandex.ru](mailto:trek-4300@yandex.ru)

#### **РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МАТРИЦЫ ИЗ L-ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА**

Цель работы — разработка получения методом электроспиннинга матрицы малого диаметра на основе микро- и нановолокон L-полилактида (ПЛА), изучение ее структуры и механических характеристик, а также оценка возможности использования матрицы для получения ТИСИ без предварительного культивирования клеточного материала в длительном хроническом эксперименте *in vivo*. Методом электроплетения (Nanon 01A) получены трубчатые графты с внутренним диаметром 1,1 мм из нановолокон ПЛА, размер пор 10–30 мкм. Изучены механические характеристики образцов полученных графтов и их барьерные свойства. Определены такие показатели как модуль упругости, прочность на разрыв, разрывная деформация (Instron 5943). Исследование адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани крысы, позволило оценить совместимость синтетического материала на основе нановолокон с клеточной культурой. Полученные графты имплантировали в качестве линейных протезов в брюшную аорту крыс ( $n = 21$ ). Полученный материал подвергался гистологическому исследованию, выполнялась электронная микроскопия, иммуногистохимическое исследование (CD 31+). Полученные матрицы обладали супрафизиологическими механическими свойствами. Показано, что МСК активно пролиферируют на графтах из полилактида. При электронной микроскопии эксплантатов первые признаки биодеградации волокон полимера отмечены через 12 нед. Тогда же окончательно формируется эндотелиальная выстилка (CD 31+) и субэндотелиальный слой на всем протяжении графтов. В сроки от 1 до 16 мес.

происходит проградцентная биодеградация волокон полимера, стенка имплантата замещается соединительной тканью. Через 14 мес. стенка протеза представлена соединительной тканью с импрегнированными в нее элементами волокон полимера, на внутренней поверхности располагается неоинтима, представленная эндотелиальными клетками и субэндотелиальным слоем, образованным в свою очередь коллагеновыми и эластиновыми волокнами. При ангиографии протез свободно проходит, признаков его стенозирования или дилатации нет. Через 16 мес. ( $n = 3$ ) происходит тотальная биорезорбция полимера, в результате стенка образованного «сосуда» состоит из соединительной ткани, развивается аневризма всей зоны реконструкции. Проприодимость графтов составила 71 (15/21)%. Полученная методом электроплетения матрица из биоразлагаемого полимера обладает достаточными физико-механическими свойствами для имплантации в сосудистое русло. В опытах *in vivo* доказана ее безопасность, биосовместимость. Низкие механические свойства соединительной ткани, образовавшейся на основе матрицы из биодеградируемого полимера, являются причиной образования аневризмы зоны реконструкции, что свидетельствует о необходимости предварительного культивирования клеточного материала *in vitro* или внедрения в состав матрицы биостабилизаторов полимеров.

Финансирование исследования: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект 14-33-00003).

**Попова О.В.**

Институт философии РАН  
[J-910101980@yandex.ru](mailto:J-910101980@yandex.ru)

#### **КОММОДИФИКАЦИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ: НОРМАТИВНЫЙ АСПЕКТ**

Коммодификация тела (от англ. commodity — товар), его частей и субстанций — важнейший тренд последних десятилетий. За ним стоит экспансия рыночной экономики в сферы, которые прежде считались ограниченными для действия законов рынка. Ограниченными не только правовыми нормами, но прежде всего нормами морали, общественной чувствительностью, культурно-мировоззренческими стереотипами и т.д. Ограниченными кроме всего прочего картиной мира, в которой тело человека и полученные из него биоматериалы до определенного этапа развития науки и техники (в частности, до появления представлений о ликвидности знания) не рассматривались как товар и не могли использоваться с целью получения прибыли. Среди наиболее распространенных современных тенденций коммодификации телесности можно упомянуть продажу биообразцов для биобанков, патентование генов, развитие нелегальных рынков человеческих органов и тканей человека (речь идет не только об их незаконной трансплантации, но и исследованиях на них), продажу жидкостей тела (крови, грудного молока), оплачиваемое участие в клинических испытаниях лекарственных препаратов. В эпоху развитых биотехнологий человеческое тело становится очень привлекательным объектом для экономических «инвестиций» в большинстве развитых стран мира. Российские граждане также постепенно становятся участниками судебных процессов, отстаивая свои права на использование тех или иных биологических материалов, источни-

ком которых являются их собственные тела, повторяя тем самым путь Европы и США. Эта тенденция будет, скорее всего, развиваться ускоренными темпами, в частности, в связи с тем, что в России запущен процесс развития биобанкинга. Деятельность современных биобанков основана на реализации интродуцированной экономической составляющей-извлечением прибыли из такого специфического коммерческого актива, как биоматериалы. Вместе с тем, необходимо подчеркнуть, что экономический подход к развитию биобанкинга не должен игнорировать нормативный. Этические и правовые нормы цивилизованного развития биобанков требуют транспарентности в вопросах о происхождении того или иного биообразца, получения информированного согласия на использование биоматериалов и т.д. Неотъемлемой составляющей регулирования процессов манипуляции биологическими материалами и их коммодификации является осмысление мировоззренческих оснований этих процессов, позволяющее понять, какие блага могут быть объектами коммодификации, и создать адаптационные механизмы для ее цивилизованного развития или запрета в отношении тех или иных аспектов жизни.

**Прудников Т.С., Китаева К.В., Гомзикова М.О., Ризванов А.А., Соловьева В.В.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
fahonsa@gmail.com

#### **ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВИТАЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ САМООРГАНИЗАЦИИ СТРОМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Исследование самоорганизации стромальных и опухолевых клеток в ко-культуре актуально для понимания процессов, происходящих в стромальном микроокружении опухоли, которое играет ключевую роль в процессах развития опухоли и ее прогрессии, метастазирования и формирования устойчивости к химио- и лучевой терапии. Для оценки поведения клеток в ко-культуре, их взаимодействий и последующего анализа отдельных клеточных популяций используют различные методы флуоресцентного витального окрашивания. В настоящей работе проведен сравнительный анализ различных методов флуоресцентного окрашивания для анализа самоорганизации мезенхимных стромальных клеток (МСК) и опухолевых клеток SH-SY5Y в ко-культуре. МСК выделяли из костного мозга человека методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла с последующей адгезией к пластику. МСК и SH-SY5Y перед внесением в смешанную культуру были предварительно окрашены мембранными красителями VybrantDiD (красный) и DiO (зеленый). После окрашивания клетки культивировали на пластике, покрытом желатином, при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Самоорганизацию клеток анализировали через 48 ч. инкубации. Цитофлуориметрический анализ отдельных клеточных популяций после 120 ч. совместного культивирования проводили на приборе FACSAriaIII. После витального окрашивания МСК и SH-SY5Y имели красную и зеленую флуоресценцию, что позволяло легко различить данные клеточные типы в ко-культуре. При совместном культивировании в течение 48 ч. МСК и

SH-SY5Y на пластике, покрытом желатином, клетки SH-SY5Y образовывали островки в монослое МСК, которые, в свою очередь, формировали каналоподобные структуры. Цитофлуориметрический анализ показал высокую степень обмена мембранными компонентами между МСК и SH-SY5Y, что приводило к смешению спектров флуоресценции клеток в ко-культуре. Кроме того, окрашенные клетки в процессе деления теряли мембранный краситель, что затрудняло визуализацию при длительном культивировании. Таким образом, не целесообразно использование мембранных флуоресцентных красителей для исследования самоорганизации клеток при длительном культивировании. В качестве альтернативного метода флуоресцентного витального окрашивания использовали трансдукцию клеток лентивирусами (LV), кодирующими красный (RFP) или зеленый (GFP) флуоресцентные белки. Для получения LV использовали ко- трансфекцию пакующей линии клеток HEK293T тремя плазмидами: векторной (pLX303-RFP или pLX303-GFP), оболочечной psPAX2 и упаковочной pCMV-VSV-G. МСК и SH-SY5Y трансдуцировали полученными LV с MOI 10. Для получения стабильных линий МСК-RFP и SH-SY5Y-GFP, экспрессирующих красный и зеленый флуоресцентные белки, через 72 ч. после трансдукции клетки сортировали по красной или зеленой флуоресценции. Отмечено, что при длительном культивировании МСК-RFP и SH-SY5Y-GFP не теряли флуоресценцию. Таким образом, лентивирусная трансдукция для витального флуоресцентного окрашивания клеток является целесообразным методом визуализации клеток в ко-культуре.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60201 и программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

**Пулин А.А.<sup>1</sup>, Еремин И.И.<sup>1</sup>, Бозо И.Я.<sup>2</sup>, Буздин А.А.<sup>3</sup>, Корсаков И.Н.<sup>1</sup>, Зорин В.Л.<sup>2</sup>, Сабурин И.Н.<sup>1</sup>, Копнин П.Б.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

<sup>2</sup> ПАО «Институт стволовых клеток человека»

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России  
andrey पुलин@gmail.com

#### **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЕСНЫ**

В наших предыдущих исследованиях была впервые продемонстрирована возможность миогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) десны как на ранних, так и на поздних пассажах. В дальнейшем при сравнении ММСК, выделенных из подвижной (альвеолярной) и прикрепленной частей десны, нами было установлено, что только клетки подвижной десны обладают способностью к миогенной дифференцировке. Для уточнения механизмов, лежащих в основе избирательной способности ММСК из различных анатомических областей десны к миогенной дифференцировке, нами выполнены эксперименты по транскрипционному профилированию ММСК при-

крепленной и подвижной десны до и после индукции миогенной дифференцировки. В качестве контрольных клеток использовали фибробласты кожи и стромальные клетки поперечно-полосатой мышечной ткани. При сравнении ММСК прикрепленной десны с недифференцированными ММСК подвижной десны выявлено 38 дифференциально экспрессирующихся гена и 2 дифференциально активированных сигнальных пути. Наиболее значимые отличия зарегистрированы для генов NGT1, FERMT2, DYNLL1, GPLD1, TRAF5. На уровне молекулярных путей зарегистрирована дифференциальная регуляция каскада сигнального пути Wnt – «WNT Pathway Cell Survival» и каскада хемокинового сигнального пути – «Chemokine ePathway Gene Expression and Apoptosis via ELK1». Дифференциальная активация последнего каскада была также идентифицирована при нескольких попарных сравнениях ММСК подвижной десны и стромальных клеток мышечной ткани, как дифференцированных в миогенном направлении, так и недифференцированных. Установлено, что этот путь является специфичным только для миогенной дифференцировки клеток подвижной десны, но не стромальных клеток мышечной ткани. При тройном сравнении (ММСК прикрепленной десны, недифференцированные ММСК подвижной десны и недифференцированные мышечные клетки) показана дифференциальная регуляция этого пути. При детальном изучении хемокинового сигнального пути установлено, что наиболее сильная дифференциальная регуляция находится в области киназы фокальных контактов (Focal adhesion kinase, FAK). Известно, что блокирование FAK предотвращает терминальную дифференцировку прогениторных клеток. По нашим данным FAK была достоверно ингибирована на транскрипционном уровне в ММСК подвижной десны по сравнению с прикрепленной. Дополнительным подтверждением является тот факт, что второй наиболее дифференциально экспрессировавшийся при сравнении ММСК прикрепленной и подвижной десны ген FERMT2 участвует в реализации тех же биологических функций, включая клеточную адгезию и связывание интегринов. После миогенной дифференцировки ММСК подвижной десны его экспрессия падала до уровня контроля. Тот же паттерн зарегистрирован для мышечных клеток. Таким образом, активация хемокинового пути, а также взаимодействие генов FAK-FERMT2, могут являться одними из ключевых факторов, обеспечивающих миогенный потенциал ММСК подвижной десны.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).*

**Рагинов И.С.<sup>1</sup>, Егоров В.И.<sup>2</sup>, Валиуллин Л.Р.<sup>2</sup>, Vindzорова М.<sup>3</sup>, Чаиркин И.Н.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности

<sup>3</sup> Medical University

<sup>4</sup> Медицинский университет им. Сеченова  
raginovi@mail.ru

### **ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ P2-РЕЦЕПТОРОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ И НЕРВНОЙ ТКАНЯХ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ У КРЫС**

Поиск фармакологических стимуляторов регенерации различных тканей является актуальной задачей фундаментальной медицины. В этом плане перспективными являются препараты, модулирующие активность P2-рецепторов, различные подтипы которых располагаются на всех клетках организма. Различают 7 типов ионотропных P2X-рецепторов, которые активируются пуринами и 8 типов метаболитных P2Y-рецепторов, часть которых активируется пиримидинами. Мы исследовали изменение экспрессии P2X1, P2X2, P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6-рецепторов при посттравматической регенерации в эпидермисе кожи и в чувствительных нейронах спинальных ганглиев у крыс. Травму кожи вызывали стандартизированным ожогом кожи спины (9 крыс, 1 группа). Регенерацию периферического нерва исследовали на модели передавливания седалищного нерва (8 крыс, 2 группа). Через 15 сут. после травмы у животных выделяли область ожога с окружающими тканями (1 группа) и фрагмент нерва дистальный от области повреждения (2 группа). Контролем служили: кожа здоровых животных (1 группа) и спинномозговой узел контралатеральной стороны (2 группа). Материал фиксировали в формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Иммуногистохимическим методом при помощи антител к указанным типам P2-рецепторов исследовали изменение количества иммунопозитивных клеток. По сравнению со здоровой кожей после ожога значительно возрастает количество клеток эпидермиса экспрессирующих P2X5, P2X7 и P2Y6. В интактном спинномозговом узле большинство малых нейронов (образуют безмиелиновые волокна, осуществляют болевую чувствительность) экспрессируют P2Y1 рецепторы, а большие и средние нейроны (миелиновые волокна, механорецепция) экспрессируют преимущественно P2Y4 рецепторы. ПК 15 сут. после травмы практически все нейроны экспрессируют P2Y1- и P2Y4-рецепторы. Полученные данные указывают на перспективность использования фармакологических препаратов, модулирующих активность P2-рецепторов, в качестве стимуляторов посттравматической регенерации кожи и периферического нерва.

**Ратушный А.Ю., Ездакова М.И.,  
Буравкова Л.Б.**

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических  
проблем РАН  
Ratushkin@mail.ru

**АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПАССИРОВАНИИ  
В УСЛОВИЯХ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ  
КИСЛОРОДА**

В настоящее время применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) является перспективным направлением в регенеративной медицине. Среди прочего, МСК способны стимулировать ангиогенез, в первую очередь, посредством продукции ряда паракринных факторов. Однако их ангиогенный потенциал напрямую зависит как от функционального состояния самих клеток, так и факторов микроокружения. Целью работы было изучение ангиогенного потенциала МСК при длительном пассировании в условиях с различным содержанием кислорода. В экспериментах использовали МСК, выделенные из жировой ткани человека и постоянно культивируемые при 20% O<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Влияние кондиционированной среды (КС) МСК на рост кровеносных сосудов оценивали *in vitro* на Матригеле и *in vivo* на хориоаллантоисной оболочке (ХАО) яиц японского перепела (*Coturnix coturnix japonica*). Для этого использовали среду, в которой 72 ч. культивировали клетки на стадии 70–90% конfluence. Для анализа механизмов, лежащих в основе обнаруженных изменений, при помощи ПЦР-РВ оценивали экспрессию генов, связанных с ангиогенезом, а также концентрацию паракринных медиаторов в КС методом иммуноферментного анализа. Было показано, что КС МСК поздних пассажей (p17-23), которые достигли состояния репликативного старения, стимулировала формирование тубулярных структур на Матригеле менее выражено, чем среда клеток ранних пассажей (p2-6). Сходные результаты были получены в аналогичных экспериментах с ХАО яиц перепела. Снижение уровня кислорода в атмосфере культивирования МСК до тканевых значений (5%) повышало ангиогенную активность КС на всех этапах культивирования, что подтверждено на обеих моделях. Оценка экспрессии позитивных регуляторов ангиогенеза клеток поздних пассажей выявила разнонаправленные изменения при 20% O<sub>2</sub>. Отмечено повышение транскрипционной активности генов IL-6, IL-8, FGF-2, BDNF, ANGPT, VEGF и снижение IGF-1, BMP-6, GDF15, PDGFRB, TGFβ3, MCP-1 в КС. Анализ уровня продукции ключевых секретируемых медиаторов также выявил повышение уровня IL-6, IL-8, VEGFα и снижение уровня MCP-1. Концентрация TGFβ1, способного, помимо прочих воздействий, индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток, в зависимости от времени культивирования значительно не изменялась. Постоянное культивирование МСК при тканевых значениях кислорода (5%) приводило к снижению продукции TGFβ1 и увеличению MCP-1 на всех этапах культивирования, в то время как концентрация других исследуемых медиаторов изменялась незначительно. Таким образом, полученные результаты указывают на снижение ангиогенного потенциала МСК при репликативном старении. При этом, при 5% O<sub>2</sub> ангиогенные свойства КС усиливаются на всех этапах культивирования. Исходя из полученных

данных, можно предположить, что в основе модулирующего эффекта тканевого уровня кислорода могут лежать такие медиаторы как MCP-1 и TGFβ1.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01244 и программы Президиума РАН «Интегративная физиология».*

**Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г.**

НИЦ «Курчатовский институт»  
ratushnyak\_marya@mail.ru

**СЕКРЕЦИЯ НЕЙРОТРОФИНОВ И ЦИТОКИНОВ  
МСК ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ МЫШИ  
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ  
ОБЛУЧЕННЫХ НСК**

В состав секретома мезенхимальных стволовых клеток (МСК) входит большое количество биологически активных соединений, что определяет потенциал использования этих клеток для стимуляции регенерации, в том числе при пострадиационных повреждениях. Нарушение когнитивных функций в отдаленный период после облучения мозга при лучевой терапии связывают с повреждением нейральных стволовых клеток (НСК) в зубчатой субстанции. Целью работы явилось исследование уровня образования и активности нейротрофинов и ряда цитокинов в МСК из разных тканей мыши и возможности использования комплекса секретируемых МСК факторов для повышения выживаемости облученных НСК. МСК выделяли и из костного (МСК-КМ) и головного мозга (МСК-ГМ), а также из жировой ткани (МСК-ЖТ) мыши. НСК выделяли из головного мозга новорожденных мышат, культивировали и характеризовали по набору специфических антигенов. С помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии было показано, что 86–92% НСК (6–9 пассаж) были нестин-положительными, кроме того в культурах НСК присутствовало небольшое количество клеток, содержащих маркеры дифференцировки астроцитов, нейронов, олигодендроцитов, и предшественников олигодендроцитов, таким образом, полученные препараты соответствовали фенотипу НСК. Уровень экспрессии генов нейротрофинов NGF, BDNF, NT3, NT4 и GDNF в МСК определяли методом ОТ/ПЦР, а их активность в культуральной среде МСК по стимуляции дифференцировки клеток линии PC12. Концентрацию цитокинов VEGF, HGF, TGFβ, IL6, G-CSF, FGF и IL-10 определяли иммуноферментным методом. Наиболее высокий уровень экспрессии генов и активности NGF и BDNF обнаружены в МСК-ЖТ. Активность нейротрофинов в среде, кондиционированной МСК-ЖТ (КС), была сравнима с активностью NGF и значительно превышала активность среды, полученной при культивировании МСК-КМ и МСК-ГМ. В МСК-ЖТ обнаружен также наиболее высокий уровень секреции VEGF и HGF, поэтому для получения КС для исследования ее влияния на выживаемость НСК были выбраны МСК-ЖТ. НСК подвергали действию γ-излучения в дозах 0,1; 1, 2 и 4 Гр. Через 1 ч. после облучения к НСК добавляли 5, 10, 25 или 50% среды, кондиционированной МСК (КС). Выживаемость НСК оценивали через 72 ч. после облучения. Количество и размер образующихся в культуре нейросфер снижались пропорционально дозе облучения. Показано, что защитный эффект КС зависит от дозы облучения НСК и от концентрации КС. При небольших дозах 0,5 и 1 Гр обнаруже-

но защитное действие КС при ее концентрации 10 и 25%. Наиболее эффективная защита обнаружена при концентрации КС, равной 25%. При дозе 2 Гр выживаемость облученных НСК в присутствии КС МСК, также превышала выживаемость облученных клеток на 10–13%. При облучении НСК в дозе 4 Гр наблюдалась только тенденция к повышению выживаемости. Таким образом, показано повышение выживаемости НСК, облученных в дозах 0,5; 1 и 2 Гр при действии КС МСК.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 15-29-01234.*

**Ребенкова М.С.<sup>1</sup>, Патышева М.Р.<sup>2</sup>,  
Гомбожапова А.Э.<sup>1</sup>, Рябов В.Б.<sup>3</sup>, Рябов В.В.<sup>1</sup>,  
Кжишковска Ю.Г.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> НИИ кардиологии томского НИМЦ

<sup>2</sup> НИИ онкологии томского НИМЦ

<sup>3</sup> Institute of Transfusion Medicine and Immunology, University of Heidelberg, Medical Faculty Mannheim, Mannheim mariambf@mail.ru

#### **АПРОБАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ МОНОЦИТОВ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Моноциты являются ключевыми клетками врождённого иммунитета и играют важную роль в переходе от воспаления к регенерации, а также интересны в качестве предшественников тканевых макрофагов, дендритных клеток, миелоидных клеток-супрессоров. Функции моноцитов и их пластичность изучаются при различных заболеваниях, в частности, при инфаркте миокарда, поэтому актуален поиск подходящей методики для выделения моноцитов у пациентов с инфарктом миокарда для постановки модельных систем *ex vivo* с целью функционального анализа моноцитов, специфичных для регенераторных и воспалительных процессов в сердечной мышце и коронарных артериях.

**ЦЕЛЬ.** Апробировать и внедрить в научную и клиническую практику методику выделения моноцитов из 30 мл венозной крови с использованием маркера CD14 у пациентов с инфарктом миокарда.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** 30 мл венозной крови 3 больных инфарктом миокарда и 3 здоровых доноров забирали в вакутейнеры с цитратным буфером. Кровь переносили во флакон для клеточных культур, доводили до 60 мл буфером PBS, центрифугировали на градиенте плотности 1,077 г/мл. Проводили отмывку полученной мононуклеарной фракции, подсчитывали с помощью автоматического счётчика. В качестве маркера сепарации использовали молекулу поверхностного рецептора основной субпопуляции моноцитов – CD14. Мононуклеарную фракцию подвергали позитивной магнитной сепарации по протоколу компании MiltenyiBiotec, Германия. Полученные CD14+ моноциты подсчитывали с помощью автоматического счётчика. Чистоту фракции CD14+ клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии, жизнеспособность клеток определяли с маркером PI (йодистым пропидием). Для культивации клеток в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл использовали бессывороточную среду X-VIVO 10TM (Cambrex), содержащую цитокины IL-4 и IFN $\gamma$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** У здоровых доноров среднее количество мононуклеаров составило  $17,83 \times 10^6$  клеток, а моноцитов  $6,2 \times 10^6$  клеток. Среднее количество мононуклеаров у пациентов с инфарктом миокарда составило  $18,5 \times 10^6$  клеток, среднее количество моноцитов  $5,8 \times 10^6$  клеток. При получении мононуклеаров коэффициент вариации составил 18%, а при выделении моноцитов 16%. С помощью йодистого пропидия установлено количество клеток, не подверженных апоптозу – 94–95%. При этом чистота выделенных моноцитов составила 95–97%. Это позволяет проводить исследования генома и эпигенома, транскриптома полученных клеток, а также проводить исследование свойств культуры клеток в условиях *in vitro*.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Была апробирована и освоена методика по выделению и культивации моноцитов из 30 мл периферической крови, которая оказалась эффективна, при этом получены хорошие показатели чистоты и жизнеспособности фракции моноцитов. Данная методика внедрена в научную практику по изучению моноцитов у пациентов с инфарктом миокарда.

Финансирование исследования: *Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-01268/16).*

**Соловьева В.В.<sup>1</sup>, Деев Р.В.<sup>2</sup>, Исаев А.А.<sup>3</sup>,  
Ризванов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

<sup>3</sup> Институт стволовых клеток человека rizvanov@gmail.com

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМИДЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ SDF-1 $\alpha$ И VEGF165 IN VITRO**

Фактор стромальных клеток 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) и сосудистый эндотелиальный фактор роста 165 (VEGF165) играют важную роль в ангиогенезе и выполняют трофическую функцию. SDF-1 $\alpha$  является хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток-предшественников из костного мозга через CXCR4-зависимый механизм и способствует формированию новых кровеносных сосудов. VEGF165 обладает нейротрофическими, нейротрофическими и про-ангиогенными свойствами. В настоящее время активно исследуется возможность применения данных факторов роста для регенеративной медицины. В настоящем исследовании проанализирован ангиогенный потенциал плазмиды pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$ , одновременно экспрессирующей VEGF165 и SDF-1 $\alpha$ . Для исследования ангиогенного потенциала использовали кондиционированную среду мезенхимных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани человека (МСК-ЖТ) и HEK293T, трансфицированных плазмидой pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$ . Экспрессия рекомбинантных белков VEGF165 и SDF-1 $\alpha$  в трансфицированных клетках была подтверждена иммунофлуоресцентным анализом, ИФА и иммуноблоттингом. Было показано, что кондиционированная среда клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$  стимулирует формирование капиллярно-подобных структур эндотелиальными клетками из пупочной вены человека HUVEC на Матригеле *in vitro*. Также проведен ана-

лиз пролиферативной активности клеток HUVEC при культивировании с добавлением 30% кондиционированной среды клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$ . Методом MTS-теста показано, что кондиционированная среда трансфицированных клеток HEK293T на 30% повышает пролиферативную активность клеток HUVEC по сравнению с нетрансфицированными клетками. Уровень продукции цитокинов/хемокинов INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1 оценивали на мультиплексном анализаторе Luminex200 с использованием микросфер MILLIPLEXMAP. Концентрации анализов были рассчитаны с использованием стандартной кривой, с помощью программного обеспечения LuminexIS 2.3. Было показано, что генетическая модификация MCK-ЖТ плазмидой pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$  приводила к значительному повышению концентрации IL-8 (10814 пг/мл) и MCP-1 (23812 пг/мл) в культуральной среде по сравнению с нетрансфицированными клетками (1588 и 4954,5 пг/мл). IL-8 известен как сильным индуктор ангиогенеза. По литературным данным рекомбинантный IL-8 стимулирует выживание и пролиферацию клеток HUVEC, а также продукцию матриксных металлопротеиназ MMP-2 и 9. MCP-1-индуцированный ангиогенез опосредуется через каскад реакций с участием VEGF165 и активацией белка RhoA. Этим можно объяснить повышение уровня MCP-1 в культуральной среде генетически модифицированных MCK-ЖТ. Таким образом, плазида pBud(Kan)-VEGF165-SDF-1 $\alpha$  проявляет ангиогенные свойства в культуре клеток *in vitro*. В связи с большим интересом к разработке невирусных технологий для регенеративной медицины, данная плазида, одновременно экспрессирующая VEGF165 и SDF-1 $\alpha$ , может лечь в основу новых методов стимуляции терапевтического ангиогенеза.

Финансирование исследования: *Программа повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

**Ризванов А.А., Гомзикова М.О.**

Казанский федеральный университет  
Rizvanov@gmail.com

### **ИСКУССТВЕННЫЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ ИЗ СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: ПОЛУЧЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Микровезикулы — высвобождаемые клетками человека мембранные везикулы, которые содержат белки, нуклеиновые кислоты, липиды и опосредуют межклеточную коммуникацию в организме человека (Baglio et al., 2015). Микровезикулы проявляют биологические свойства родительских клеток. Риски клеточной терапии, связанные с онкотрансформацией, привели к развитию концепции бесклеточной терапии, перспективным инструментом которой являются микровезикулы. Однако развитие клинических протоколов сдерживает ограниченный выход микровезикул.

С целью увеличения выхода микровезикул, мы применили метод обработки клеток человека цитохалазином В (Pickett et al., 2005). Цитохалазин В приводит к дезорганизации актинового цитоскелета клетки, имитируя действие Ca<sup>2+</sup>-зависимого фермента кальпаина (Pudduet et al., 2010; Morel et al., 2011).

Целью нашей работы явилась характеристика и оценка биологической активности индуцируемых с помощью цитохалазина В микровезикул, или искусственных микровезикул (иМВ).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Так как мишенью действия цитохалазина В являются актиновые микрофиламенты, мы исследовали структуру актинового цитоскелета в клетках-донорах и наличие молекул актина в составе иМВ. Методом конфокальной микроскопии и иммуноблотинга нами было показано, что в иМВ происходит включение фрагментов актиновых микрофиламентов. Известно, что в процессе образования естественные микровезикулы клеток человека также захватывают фрагменты актиновых микрофиламентов, что является отличительным признаком микровезикул (Antonyak et al., 2011; Kawamoto et al., 2012). Методом электронной микроскопии было установлено, что размер иМВ SH-SY5Y составляет от 100 нм до 1800 нм с пиком в области 100–600 нм. С целью исследования проявляют ли иМВ биологические свойства клеток-доноров была оценена ангиогенная активность иМВ клеток линии SH-SY5Y, которые известны своей способностью стимулировать ангиогенез (Rizvanov et al., 2010). В результате проведенных исследований установлено, что иМВ стимулируют формирование капиллярно-подобных структур эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro* подобно клеткам-донорам SH-SY5Y. При подкожном введении в матрикс Matrigelin vivo иМВ стимулируют прорастание кровеносных капилляров, плотность которых на единицу площади гистологического среза статистически значимо (значение  $p < 0,01$ ) превышала контрольный образец (подкожная инъекция матрикса Matrigel) в 12,7 раз.

**ВЫВОДЫ.** Размер получаемых иМВ сопоставим с размером естественных микровезикул. Проявление иМВ биологической активности родительских клеток свидетельствует о возможности безопасного и эффективного использования регенеративного и ангиогенного потенциала иМВ стволовых, эндотелиальных прогениторных клеток и др. Применение цитохалазина В позволяет увеличить выход иМВ и сделать процедуру выделения и очистки промышленно применимой. Это, в свою очередь, будет способствовать развитию подходов с применением иМВ для терапии ишемических повреждений нижних конечностей, инсульте, инфаркте.

Финансирование исследования: *Госзадание 20.5175.2017/6.7 Минобрнауки РФ.*

**Родина А.В.<sup>1</sup>, Сапрыкин В.П.<sup>2</sup>, Горшкова Л.Б.<sup>1</sup>, Тенчуринов Т.Х.<sup>1</sup>, Москалева Е.Ю.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

<sup>2</sup> ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»

ФМБА России

alla.rodina@bk.ru

### **ДИНАМИКА ИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОК В ИМПЛАНТИРОВАННЫЕ ТРЕХМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА С РАЗЛИЧНОЙ ТОПОГРАФИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ**

Разработки в области технологии создания полимерных матриксных как важной составляющей тканевой инженерии и исследование механизмов их биосовместимости являются основными задачами в процессе оптимизации структуры биоматериалов



медицинского назначения. Целью работы явилось исследование влияния пространственной организации микроволоконистых матриц из полилактида (ПЛА) на регенеративную активность тканей после их имплантации животным с мезенхимными стволовыми клетками (МСК) и без. Получали МСК костного мозга мышей и определяли уровень экспрессии типичного набора поверхностных антигенов с помощью проточной цитометрии. Матрицы изготавливались электроформованием из 9% раствора ПЛА в хлороформе и состояли из волокон со средним диаметром  $8,75 \pm 1,25$  мкм, пор со средним размером  $33 \pm 0,5$  мкм, пористостью  $80 \pm 5\%$ , при этом различались по толщине (100 мкм и 600 мкм), распределению и ориентации волокон. Матрицы диаметром 1 см с МСК и без имплантированы подкожно после создания дефекта кожи у животных. Они извлекались через 7, 14, 21 сут. Заливку образцов в парафин и окрашивание срезов гематоксилин-эозин проводили по стандартной методике. При извлечении имплантов обнаружены образовавшиеся вокруг тонкие фиброзные капсулы. Гистологическое исследование показало, что через 7 сут. после имплантации в матриксах толщиной 600 мкм без МСК наблюдалась миграция клеток в прилегающий к тканям слой матрикса, а в матриксе с МСК было сформировано большое количество кровеносных сосудов, наблюдалась значительная инфильтрация клетками и образование собственного межклеточного матрикса. В матриксе толщиной 100 мкм с МСК через 7 сут. наблюдалось незначительное количество микрососудов и неравномерное распределение клеток по всему объему матрикса. Полые пространства на гистологических срезах, указывающие на сечения волокон в матриксах толщиной 100 мкм, говорят о высокой скорости деградации и, возможно, локальном закислении, что может ограничивать миграцию и размножение клеток. Через 14 сут. в матриксах толщиной 600 мкм без МСК наблюдалась появление кровеносных сосудов и значительная инфильтрация клетками, а в матриксе с МСК произошло образование волосяных фолликулов. В матриксах толщиной 100 мкм с МСК также начиналось образование волосяных фолликулов, но активно продолжалась деградация матрикса. Через 21 сут. в матриксах толщиной 600 мкм без МСК были сформированы микрососуды, наблюдалась инфильтрация клетками и образование собственного межклеточного матрикса, матрикс 600 мкм с МСК значительно резорбировался и был замещен собственными тканями с краев раны, а в матриксе толщиной 100 мкм с МСК через 21 сут. регистрировалось небольшое количество волосяных фолликулов. Обнаруженное нами различие в скорости деградации матриц, клеточной инфильтрации и формирования микрососудов и волосяных фолликулов свидетельствует о том, что в организме эти параметры зависят от топографической структуры матриц, а их заселение МСК способствует увеличению скорости регенерации.

### **Родионов С.А.<sup>1</sup>, Мишина Е.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России  
rodionov\_085@mail.ru

### **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Однослойные полуперевиваемые культуры дермальных фибробластов были получены одними из первых и широко применяются в научных исследованиях и медицинской практике в связи с распространенностью этих клеток в организме, доступностью их выделения и относительной простотой культивирования в лабораторных контролируемых условиях. Морфологические особенности и закономерности поведения фибробластов в культуре были изучены Abercrombie M. и Neauman J.E., которыми также был открыт феномен контактного ингибирования. В настоящее время более совершенные методы оптической и электронной микроскопии позволяют получить новые данные о морфофункциональных изменениях фибробластов в процессе культивирования, изучение которых и стало целью настоящего исследования. Материалом послужили дермальные фибробласты, выделенные у здоровых доноров добровольцев. Исследование проводили методами дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии по Номарскому и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). В результате было выявлено, что на этапе нулевого пассажа ( $p_0$ ) фибробласты прикрепляются к пластиковой подложке и распластываются на ней значительно дольше, чем на этапах последующих пассажей ( $p_1$ – $p_{10}$ ), что говорит об усилении адгезивных свойств клеток в ходе их адаптации к культуральным условиям. Также были отмечены изменения размера клеток в ходе культивирования: на момент первого пассажа ( $p_1$ ) клетки достоверно ( $p \leq 0,05$ ) увеличивались в размере в 1,5 раза по сравнению клетками нулевого ( $p_0$ ) пассажа. На этапах последующих пассажей ( $p_1$ – $p_{10}$ ) статистически значимого увеличения размеров фибробластов не отмечалось. В процессе культивирования у клеток нередко можно было наблюдать «вскипание» цитоплазматической мембраны, или блеббинг, особенно выраженное на этапе открепления клеток от подложки с целью пассирования. При исследовании методом ТЭМ взвеси клеток ( $p_1$ ,  $p_5$  и  $p_{10}$ ) сразу после открепления помимо многочисленных блеббов можно было отметить зоны обводнения цитоплазмы. Появление вышеуказанных изменений не приводило к гибели клеток, однако, несомненно, указывало на стрессорное действие на клетки факторов, сопровождающих пассирование культуры. Таким образом, в процессе культивирования клетки претерпевают существенные изменения размера и адгезивных свойств. Причины этого, вероятно всего, связаны с самой технологией культивирования так как они проявляются на самых ранних его этапах, а именно при переходе клеток от нулевого ( $p_0$ ) к первому ( $p_1$ ) пассажу. Вместе с тем, нужно обратить внимание на выраженные изменения клеток под действием физических и химических факторов,

сопровождающих процесс открепления клеток, так как этот процесс всегда предшествует введению клеток в организм в методиках, использующих для терапии взвесь клеток. Дальнейшее изучение судьбы измененных клеток после введения в организм может способствовать глубокому пониманию механизмов терапевтического действия клеток.

**Романова И.В., Михрина А.Л., Михайлова Е.В., Савельева Л.О.**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН  
romanova.irina@gmail.com*

#### **УЧАСТИЕ CART-ПЕПТИДА В РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ ПОСЛЕ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

Изучение репаративных механизмов мозга имеет чрезвычайную актуальность в связи с разработкой новых медицинских стратегий, которые направлены на подавление нейродегенеративных процессов и восстановление популяций нейронов после различных поражений. Нейрогенез в мозге взрослых млекопитающих и его источники активно обсуждается в литературе (Barha C.K. et al., 2010; Kempermann G., 2016). Нейрональные прогенераторные клетки выявлены в зубчатой извилине гиппокампа и в стенке латеральных желудочков мозга. В литературе высказывается мнение о том, что пептиды гипоталамуса вовлечены в процессы дифференцировки нейронов в ходе пренатального онтогенеза, а также могут участвовать в регуляции нейрональной пластичности во взрослом мозге (Bakos J. et al., 2016). У млекопитающих CART-пептид (cocaineandamphetamineregulatedtranscript/peptide) экспрессируется в нейронах различных областей мозга, но в большей степени в гипоталамусе. У взрослых животных этот пептид оказывает, в частности, активирующее влияние на дофаминергические нейроны (Романова и др., 2012, 2013), а в ходе пренатального развития крысы идентифицируется уже на стадии E10, что, возможно, свидетельствует об его морфогенетической функции. Цель исследования — изучить гипоталамическую область рядом с зоной поражения, которая определена с помощью MPT, после 45 мин окклюзии сонной артерии (методика описана: Shevtsov M.A. et al., 2014). Использованы методы иммуногистохимии, световая и конфокальная микроскопия. На фронтальных срезах мозга крысы Вистар (третьи сутки после фокальной ишемии) проведено иммуногистохимическое исследование с помощью антител против CART-пептида, PCNA и musashi-1 (соответственно ядерный и цитоплазматический маркеры пролиферирующих клеток). Рядом с областью поражения выявлено значительное увеличение CART-иммунопозитивных структур. На последовательных срезах показано, что PCNA-иммунопозитивные ядра выявляются как в CART-, так и в musashi-1-иммунопозитивных структурах. У контрольных крыс (без ишемии) интенсивная реакция к PCNA кроме стенки латеральных желудочков мозга отмечается и в стенке 3-го желудочка. У контрольных крыс не было выявлено musashi-1-иммунопозитивных структур вдоль стенки латеральных желудочков, однако они выявляются под эндимой около стенки 3-го желудочка. После ишемии около области поражения вдоль стенки 3-го желудочка выявляются PCNA- и musashi-1-иммунопозитивные структуры.

При этом интенсивная реакция к PCNA выявлена вдоль стенки латеральных желудочков, а также в располагающихся в них сосудистых сплетениях. PCNA-иммунопозитивные ядра отмечены в сосудистых образованиях, расположенных в ткани мозга непосредственно над областью поражения. Полученные результаты указывают на репаративный потенциал гипоталамической области, а также вероятные протективные свойства CART-пептида и его участие в репаративных процессах, что, очевидно, является проявлением его морфогенетической функции, которая реализуется как в раннем онтогенезе, так и в ходе восстановления при патологии.

Финансирование исследования: *Работа выполнена на средства РФФИ (грант № 15-04-06231).*

**Романова О.А.<sup>1</sup>, Тенчурин Т.Х.<sup>1</sup>, Сафронова Е.И.<sup>2</sup>, Дёмина Т.С.<sup>3</sup>, Кляйн О.И.<sup>4</sup>, Шепелев А.Д.<sup>1</sup>, Мамагулашвили В.Г.<sup>1</sup>, Чвалун С.Н.<sup>1</sup>, Пантелеев А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*

<sup>2</sup> *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова*

<sup>3</sup> *Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН*

<sup>4</sup> *Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
olga.romanova034@gmail.com*

#### **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ ДЫХАТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТНОГО НЕТКАНОГО ДВУСЛОЙНОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА**

В силу ограниченной способности эпителия трахеи к реэпителизации, его обширное повреждение ведёт к формированию стенозов, представляющих серьезную клиническую проблему. При сохранении хрящевого каркаса трахеи, дефекты её эпителия могут быть восполнены комплексным тканевым эквивалентом. В качестве основы для создания аналогов дыхательного эпителия в системе *in vitro* традиционно используют коллагеновые губки и гели. Однако быстрая биодеградация коллагена и его неудовлетворительные механические свойства ограничивают применение подобных материалов в трансплантологии. Целью работы являлось создание оригинального биоразлагаемого матрикса на основе синтетических и натуральных полимеров, сочетающего способность поддерживать рост и дифференцировку дыхательного эпителия с механическими свойствами, отвечающими требованиям клинической практики. Перспективным методом создания таких матриксов является электроспиннинг. Нетканые материалы, полученные этим методом, обладают значительно более высокими механическими характеристиками, чем губки и гели. Однако в настоящее время данные о возможности формирования полноценного дыхательного эпителия на нетканых материалах в системе *in vitro* практически отсутствуют. На основе биоразлагаемого сополимера нами были получены пленки и нетканые матриксы (включая двуслойные) с параметрами, оптимальными для создания функциональных эквивалентов дыхательного эпителия с использованием эпителиальных клеток и первичных фибробластов из трахеи и слизистой носовых пазух человека. С помощью световой, иммунофлю-

оресцентной и электронной микроскопии, а также комплекса физико-химических и клеточных методов нами были получены следующие результаты: 1) получены плёнки на основе сополимера хитозан: желатин: поли-L-лактид (52:13:35), обеспечивающие высокий уровень пролиферации и миграции базальных клеток респираторного эпителия; 2) из данного сополимера также получен двуслойный нетканый материал, обеспечивающий в системе *in vitro* создание комплексного конструкта, включающего эпителий и подслизистую основу; 3) проведена оценка механических свойств материала, показавшая, что он обладает повышенной устойчивостью к контракции трахеальными фибробластами в сравнении с коллагеновыми губками; 4) показано, что верхний (нановолокнистый) слой материала поддерживает дифференцировку базальных клеток в направлении респираторного эпителия (реснитчатые и секреторные клетки) в системе *in vitro*, при условии введения в него гиалуроновой кислоты; 5) исследованы особенности биодegradации матрикса в системе *in vivo*. В результате нами была создана экспериментальная модель дыхательного эпителия на биоразлагаемом полимерном матриксе в системе *in vitro*, отвечающая ряду основных требований практики регенеративной терапии трахеального эпителия. Разработанная методика позволяет использовать аутологичные клетки, что открывает перспективы её клинического применения. В дальнейшем использованные подходы могут послужить методологической основой для создания биоинженерной трахеи.

Финансирование исследования: 1. *Российский фонд фундаментальных исследований и Правительство города Москвы, грант РФФИ 15-33-70035 мол\_а\_мос* 2. *НИЦ «Курчатовский институт», грант поддержки инициативных научных исследований в 2017 г.*

#### **Рубина К.А., Ткачук В.А.**

*Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
rkseniya@mail.ru*

#### **T-КАДГЕРИН – НАВИГАЦИОННЫЙ РЕЦЕПТОР, УЧАСТВУЮЩИЙ В ПРОЦЕССАХ РОСТА, РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ**

В современной биологической науке достаточно хорошо изучены морфогенетические процессы, происходящие в эмбриогенезе, однако, существенно меньше известно о генетических и эпигенетических механизмах построения архитектуры и поддержания целостности органов и тканей во взрослом организме. Детальное изучение молекулярно-биологических, биохимических и клеточных механизмов этих процессов является актуальной задачей современной биологии и медицины. Сосудистая система в норме во взрослом организме находится в состоянии равновесия, процессы ангиогенеза или регрессии сосудов четко регулируются. Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются ведущими причинами заболеваемости и смертности во всем мире. В основе сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний лежит недостаточный или избыточный ангиогенез. Знания о молекулярных и клеточных механизмах ангиогенеза необходимы для разработки новых подходов для лечения этих патологий. Понимание механизмов регуляции роста и созревания сосудов

легло в основу стратегии «терапевтического ангиогенеза», которая является одной из активно развивающейся технологий регенеративной медицины в мире. В основе этой стратегии лежит стимуляция роста и ремоделирования сосудов в ишемизированных тканях с помощью введения рекомбинантных белков ангиогенных факторов или генетических конструкций для их экспрессии. Эти же знания о механизмах ангиогенеза необходимы при разработке новых лекарств, направленных на блокирование процессов роста сосудов при избыточном или aberrантном ангиогенезе, которые выходят из-под физиологического контроля при различных заболеваниях. В последнее время помимо основных молекул, участвующих в процессах ангиогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, большое внимание уделяется изучению навигационных молекул, которые определяют направление роста вновь формирующихся сосудов. Помимо контроля траектории роста сосудов в эмбриогенезе и регенерации, навигационные молекулы играют важную роль при патологическом ангиогенезе. T-кадгерин является навигационной молекулой, для которой ранее было обнаружено участие в регуляции направленного роста аксонов. Во взрослом организме человека максимальная экспрессия T-кадгерина выявляется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии наблюдается при различных патологиях. Функция T-кадгерина в сосудах до сих пор оставалась неизвестна. Изучение роли T-кадгерина в процессах физиологического и патологического ангиогенеза, ремоделирования сосудов важно для понимания фундаментальных механизмов морфогенетических процессов в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также для решения современных задач регенеративной медицины.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счёт средств Гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086).*

#### **Рыбцов С.А.<sup>1</sup>, Бацивари А.<sup>2</sup>, Созль С.<sup>3</sup>, Лендинез Х.<sup>4</sup>, Медвинский А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Центр Регенеративной Медицины, Университет Эдинбурга*

<sup>2</sup> *Фрэнсис Крик Институт, Лондон*

<sup>3</sup> *Университет Шеффилда*

<sup>4</sup> *Чарльз Ривер Лабораториз  
srybtsov@ed.ac.uk*

#### **ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УСЛОВИЙ СОЗРЕВАНИЯ ГСК С ВЫСОКИМ РЕГЕНЕРАЦИОННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ**

Получение гематопозитических стволовых клеток (ГСК) *in vitro* остается сложной задачей, сопряжённой с генетическими манипуляциями и слабой эффективностью. Опубликованные методики дают низко-репопулирующие ГСК, имеющие ограниченную способность к ретрансплантации, ограниченный запас делений и часто демонстрируют недостаточный дифференцированный потенциал. Исследования естественного развития ГСК *in vivo* и *ex vivo* позволяют выявить иерархию предшественников ГСК в раннем эмбрионе, понять условия их дифференцировки, причины высокого регенерационного потенциала при сравнении их экспрессионных профилей. ГСК взрослого типа (способны к репопуляции взрослых реципиентов) возникает в раннем эмбрионе в ходе так называемого дефинитивного гематопоза в регионе

дорзальной Аорты, Гонад и Мезонефроса (АГМ). Принято считать, что первая ГСК созревает непосредственно из гематогенного эндотелия аорты АГМ региона и вскоре мигрирует в фетальную печень, где и достигает максимального количества в ходе деления в течение последующих 5–6 дней, до постнатальной миграции в костный мозг. Однако, нами обнаружено, что ГСК в АГМ регионе проходит в течение двух дней, последовательно, как минимум через три гемопозитически коммитированных предшественника (про-ГСК, pre-ГСК I, pre-ГСК II), не способных к дифференцировке в клетки эндотелия. Количество предшественников ГСК в день 10 после фертилизации быстро растёт от 1–2 до ~54 за 24 ч., причем наиболее пролиферирующими являются предшественники pre-ГСК-I (E10) и pre-ГСК II (E11). Далее, после созревания ГСК, пролиферативная активность последовательно снижается до одного симметричного деления за 24 ч. в фетальной печени, пока не переходит к спящему режиму с редким делением один раз за 6 мес. во взрослом костном мозге. Исследование пролиферативной фазы в день 10 развития, выявило факторы, производимые дорзальной нишей аорты, вызывающие бурное деление pre-ГСК-I и II. Генетический, гистологический и функциональный анализ привел к пониманию, что различные клеточные компоненты ниши секретируют широкий спектр факторов, определяющих деление и созревание предшественников ГСК: Фактор Стволовых Клеток (ФСК/SCF), ИЛ-3, ингибиторы морфогенов BMP сигнального пути (BMPR, Noggin). Созревание предшественников также зависит от снижения экспрессии Notch лигандов в нише и активации Runx1 транскрипционного фактора. На этой короткой по времени стадии рождаются ГСК с высоким регенерационным потенциалом, способные производить значительный вклад в подавляющее большинство линий крови и иммунной системы после трансплантации (в значительно большей степени чем ГСК взрослого организма). Дальнейший функциональный анализ ниши, процесса созревания и пролиферации ГСК в раннем эмбрионе, выявит дополнительные элементы микроокружения пролиферирующих предшественников ГСК и приведет к созданию эффективной *in vitro* методики производства высокорегенерирующих ГСК, а также позволит прояснить генетические причины пролиферативных заболеваний крови.

**Рыжов А.П.<sup>1</sup>, Фомин А.С.<sup>1</sup>, Фадеева И.В.<sup>1</sup>, Филиппов Я.Ю.<sup>2</sup>, Кнотько А.В.<sup>2</sup>, Баринов С.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН  
<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»  
 R\_alex94@mail.ru

### **КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ ЦЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ $\alpha$ -ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Регенеративный подход в лечении дефектов костной ткани является относительно новым и активно развивающимся направлением медицинского материаловедения. В рамках регенеративного подхода наиболее оправданно использование биоактивных материалов, которые со временем резорбируются с образованием костной ткани *de novo*. К таким

материалам можно отнести различные биополимеры, а также кальцийфосфатные цементы (КФЦ) и биокерамику [1]. КФЦ обладают рядом преимуществ перед керамикой: использование цемента позволяет заполнять костные дефекты практически любой формы, а также применять малоинвазивные хирургические технологии [2]. Однако существующие цементные системы также обладают рядом существенных недостатков. В настоящей работе представлена попытка устранить некоторые недостатки существующей цементной системы на основе  $\alpha$ -трикальцийфосфата ( $\alpha$ -ТКФ), такие как возможное закисление среды в зоне дефекта, низкие механические характеристики, а также слишком быстрое время схватывания.  $\alpha$ -ТКФ получали твердофазным методом, как описано [3]; полифосфат натрия получали дегидратацией однозамещенного фосфата натрия в муфельной печи при 600 °С в течение 2 ч. при естественном охлаждении с печью. Цементы получали смешиванием цементного порошка, состоящего из 1 г  $\alpha$ -ТКФ и 0,1 г цитрата натрия, с раствором с 30% дигидроортофосфата магния и глицерина. В состав цементного порошка вводили гранулы карбонат-замещенного гидроксилпатита (КГА) и полифосфат натрия (ПФН). Введение гранул КГА приводило к увеличению прочности при сжатии с 6 до 13 МПа. Максимальное упрочнение достигалось при введении 10% масс. гранул КГА. С другой стороны, щелочные гранулы КГА действовали как нейтрализаторы кислотности, что позволило добиться значений реакции среды, близких к нейтральной (pH = 7.0–7.2). Исследуемый цемент обладал временем схватывания 8 мин. Однако не всегда этого времени достаточно для проведения необходимых манипуляций в процессе хирургической операции. Для увеличения времени схватывания цемента вводили ПФН. Введение 10 % масс. ПФН позволяет увеличить время схватывания цемента с 8 до 16. Для увеличения времени схватывания до 10 мин. необходимо вводить 2,5 % масс. ПФН. Показано, что зависимость времени схватывания от доли введенного ПФН описывается линейной функцией как минимум до 10 % масс. Совместное добавление ПФН и гранул КГА к цементному порошку значительно повышает характеристики изучаемой цементной системы, однако практическая применимость данного цемента требует дальнейших исследований.

#### *Литература:*

1. Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
  2. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application // Journal of Materials Science. – 2008. – Т. 43. – № 9. – С. 3028.
  3. Формирование микроструктуры и свойства костного цемента на основе  $\alpha$ -трикальцийфосфата / И. В. Фадеева, Я. Ю. Филиппов, А. С. Фомин и др. // Неорганические материалы. – 2017. – Т. 53, № 3. – С. 281–288.
- Финансирование исследования: Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 15-29-04871-офи\_м.

**Савельева О.Е.<sup>1</sup>, Таширева Л.А.<sup>1</sup>, Исаева А.В.<sup>1</sup>, Родионов Е.О.<sup>1</sup>, Завгородская К.О.<sup>2</sup>, Перельмутер В.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ

<sup>2</sup> Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томск «НПО «Вирион»  
olga.sav.1980@gmail.com

### **ОЦЕНКА УСЛОВИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПРЕМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ НИШИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**

Клетки-предшественники костно-мозгового происхождения играют важную роль в процессах репарации тканей при повреждении. Однако этим их функции не ограничиваются. Согласно современным представлениям эти клетки принимают участие в образовании и эволюции преметастатической ниши [Kaplan R.N. et al., 2006]. Рекрутирование в очаг хронического воспаления клеток-предшественников, наряду с активацией стромальных элементов и секрецией хемокинов и цитокинов, создает благоприятные условия для выживания, пролиферации и усиления злокачественного потенциала опухолевых клеток, пришедших в место будущего метастаза [Barcellos-Hoff M.H. et al., 20013; Plaks V. et al., 20015]. В связи с этим для оценки процесса формирования преметастатической ниши при раке легкого в крови больных проводилось определение популяционного состава клеток-предшественников костно-мозгового происхождения. В исследование были включены больные с впервые диагностированным раком лёгкого в возрасте от 55 до 70 лет и объемом опухоли более 2,0 см. Критериями включения пациентов в исследование являлись: добровольное информированное согласие, морфологически верифицированный диагноз аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого; T1-4N0-3M0; отсутствие хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения. Материалом для исследования служила венозная кровь больных, в которой определяли содержание клеток, экспрессирующих CD34, CD133, CD90, VEGFR1, CD11b, CD45, CD20<sub>2</sub>, методом проточной цитофлюориметрии. Клетки, обладающие фенотипом CD34+CD20<sub>2</sub>+CD45-CD133+, идентифицировали как эндотелиальные клетки-предшественники (EPC), клетки с фенотипом CD34-CD90+CD45- как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), CD34+CD45+CD11b+ клетки как предшественники макрофагов, CD34+CD45+CD133-VEGFR1+ клетки как кроветворные клетки-предшественники (HPC). В результате проведенного исследования определен количественный и популяционный состав клеток-предшественников в крови у больных раком лёгкого. Установлено, что он характеризуется значительной гетерогенностью. Частота встречаемости в крови HPC и предшественников макрофагов составила 100%, в то время как EPC встречались в 24% случаев, а MSC – в 53% случаев. Достоверных различий в количестве и частоте встречаемости данных популяций клеток у пациентов, получавших неоадьювантную химиотерапию и без таковой, обнаружено не было. Полученные данные позволяют оценить процесс формирования преметастатической ниши и могут быть полезны для определения риска развития гематогенного метастаза.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МД-273.2017.7*

**Сагарадзе Г.Д.<sup>1,2</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>1</sup>, Макаревич О.А.<sup>1</sup>, Басалова Н.А.<sup>2</sup>, Нимирицкий П.П.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>1</sup>, Кирпатовский В.И.<sup>3,4</sup>, Охоботов Д.А.<sup>2,3</sup>, Осидак Е.О.<sup>5</sup>, Домогатский С.П.<sup>5,6</sup>, Акопян Ж.А.<sup>2,3</sup>, Камалов А.А.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена»

<sup>5</sup> ООО «ИМТЕК»

<sup>6</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России  
georgy.sagaradze@gmail.com

### **СЕКРЕТОМ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (МСК) ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Одним из основных инструментов регенеративной медицины являются стволовые и прогениторные клетки, к которым относятся мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК). МСК регулируют процессы репарации и регенерации в организме, во многом за счет секреции биологически активных продуктов, в частности, различных факторов роста и цитокинов, а также внеклеточных везикул. Согласно нашим и другим данным, кондиционированная среда, содержащая продукты секреции МСК (КС-МСК), обладает значительным регенераторным потенциалом, стимулирует восстановление кровоснабжения и иннервации тканей, способствует активации эндогенных процессов репарации за счет привлечения резидентных стволовых и прогениторных клеток и модулирует иммунный ответ при повреждении. Использование бесклеточных препаратов на основе КС-МСК позволяет преодолеть некоторые ограничения, связанные с клеточной терапией, включая более простые технологии производства, хранения и контроля качества. Однако, описанные протоколы получения КС-МСК вариabельны по многим параметрам, а надежные методы контроля качества препаратов на основе КС-МСК не разработаны, что может отразиться на эффективности и безопасности таких продуктов. Мы разработали оптимизированный протокол производства КС-МСК жировой ткани человека с использованием реагентов и расходных материалов, разрешенных для клинического применения. Были выбраны и отработаны методики контроля качества препаратов на основе КС-МСК, в том числе для оценки специфической активности *in vitro* на различных клеточных моделях. Для преодоления проблемы высокой вариabельности образцов КС-МСК, полученных от клеток разных доноров, методом логистической регрессии был оценен вклад концентрации отдельных ключевых факторов роста, опосредующих эффекты МСК, в специфическую активность КС-МСК *in vitro*. Способность КС-МСК стимулировать регенерацию различных тканей мы оценили на нескольких моделях *in vivo*. Так, на модели экспериментального крипторхизма у крыс было показано, что инъекция комбини-

рованного препарата на основе КС-МСК и коллагенового геля в качестве биосовместимого носителя способствовала восстановлению нарушенного сперматогенеза. Введение препарата под белочную оболочку яичка приводило к уменьшению выраженности гипотрофии крипторхированных яичек, повышению общего количества сперматозоидов и их подвижной фракции, способствовало нормализации процессов сперматогенной дифференцировки и снижению количества склерозированных/атрофических семенных канальцев, а также значительному улучшению состояния поддерживающих сперматогенез клеток Сертоли и Лейдига. Важно отметить, что введение препарата на основе КС-МСК оказало выраженное воздействие на восстановление сперматогенеза, сравнимое с результатами введения самих МСК. Таким образом, использование препаратов и биоматериалов нового типа на основе продуктов секреции МСК человека является перспективным инструментом для стимуляции регенерации тканей и может быть во многих случаях более предпочтительным, чем клеточная терапия с применением МСК. Однако, учитывая комплексность состава и сложный механизм действия таких препаратов, необходимо внедрять специально разработанные технологии их производства, стандартизации и контроля качества, в том числе подходы к снижению влияния вариабельности между донорами клеток, для повышения безопасности и эффективности этих продуктов и в итоге успешной трансляции их в клинику.

Финансирование исследования: *Исследования выполнены в рамках госзадания и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова, а также с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФИ № 14-50-00029.*

**Садыкова Ф.Р., Воробьев В.В.,  
Абдуллин Т.И.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*  
sadykova.farida@mail.ru

#### **РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ КРИОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ НАНОРАЗМЕРНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА**

Повреждения опорно-двигательной системы являются одними из наиболее распространенных видов травм, которые представляют серьезную медицинскую проблему. Актуальным направлением является создание биоиндуктивных материалов, выполняющих не только опорную функцию, но и способных стимулировать регенерацию костных дефектов. Создаваемые остеоиндуктивные материалы должны обладать биоимитирующей структурой, включающей белковые и неорганические компоненты, прежде всего, гидроксипатит кальция (ГАП). Оптимизирован способ жидкофазного осаждения наноразмерного ГАП с массовым выходом продукта до 70%. По данным динамического рассеяния света частицы ГАП в водном растворе имеют средний гидродинамический диаметр ~900–1100 нм и слабоанионные свойства поверхности (дзета-потенциал –  $14 \pm 6,8$  мВ). По данным сканирующей электронной микроскопии, полученный ГАП состоит из однородных отдельных наноразмерных частиц размером менее 50 нм и характеризуется соотношением Са/Р 1.8–1.9. Исследованы процессы осаждения на-

ночастиц ГАП на поверхности криогеля из желатина. Присутствие ГАП в составе криогеля анализировали методом ИК-Фурье спектроскопии по появлению характеристических пиков. Введение ГАП уменьшает способность криогеля удерживать воду в порах и в гидрогелевом компоненте вследствие повышения жесткости. Исследовано поведение хондро- и остеогенных клеток линии ATDC5 в контакте с криогелями. Установлено, что композиционный криогель более эффективно поддерживает миграцию и пролиферацию клеток ATDC5, чем однокомпонентный. Результаты показывают, что разработанные криогели на основе наноразмерного ГАП могут быть использованы в качестве матрикса для исследования процессов остеогенной цитодифференцировки.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках Государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета (КФУ) среди ведущих мировых научно-образовательных центров и с участием ООО «Биомедтех КФУ». Использовано оборудование Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ.*

**Сазонов С.В.<sup>1,2</sup>, Коротких А.Г.<sup>1</sup>,  
Леонтьев С.Л.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»*

<sup>2</sup> *ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»*

prof-ssazonov@yandex.ru

#### **РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ МИЕЛИНОВЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В КОНДУИТЕ НЕРВА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК**

Травму нерва осуществляли в модели на лабораторных кроликах. Всего прооперировано 29 животных (вес животных 4–5 кг, возраст 6–7 мес., самцы), которые были распределены на две группы. На перерезанный седалищный нерв накладывали конduit из тефлонового сосудистого протеза, который заполняли одностенными углеродными нанотрубками. Коллатеральная (правая) конечность служила в качестве контрольной на которой проводилось такое же оперативное вмешательство, что и на опытной только без применения углеродных нанотрубок. Животных из группы № 1 через 3 мес. вывели из эксперимента, из группы № 2 через 6 мес. Изготавливали полутонкие гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали при световой микроскопии, проводили электронно-микроскопические исследования с использованием микроскопа «Morgagni 268D» при увеличениях от 1800 до 11000. Для исследования брали три участка: проксимальный, дистальный и участок в области наложения кондуита нерва. При гистологическом исследовании на поперечных срезах нервов обнаружены сечения осевых цилиндров нервных волокон и покрывающие их глиальные оболочки. Между нервными волокнами в составе нервного пучка располагаются тонкие прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой мало клеток, преобладают ретикулярные волокна, проходят мелкие кровеносные сосуды. У всех кроликов в месте прямого приложения травмирующей силы к нерву в результате воспалительных, глиальных реакций образовался соединительнотканый рубец. В рубце можно выделить три зоны, отличающиеся

по клеточному составу: а) центральную — соединительнотканную; б) промежуточную — глио-соединительнотканную по обе стороны от центральной зоны; в) периферическую — глиозно-кистозную. Вокруг шовного материала сформировалась соединительнотканная капсула и клеточная инфильтрация ткани. При гистологическом исследовании седалищных нервов опытной конечности с применением SWNT в проксимальных частях обнаружены по 2–4 нервных пучка диаметром от  $966,50 \pm 23,56$  мкм до  $365,00 \pm 35,00$  мкм. В области шва сформировался глиальный рубец. В дистальных участках нервов опытных конечностей на гистологических срезах видны многочисленные нервные стволы диаметром от  $183,00 \pm 17,00$  мкм до  $630,00 \pm 100,00$  мкм. При электронной микроскопии обнаружены широкие прослойки из волокон между очагами активно пролиферирующих швановских клеток, частично дегранулированные тучные клетки, дистрофия миелина нервных волокон по типу «луковичной шелухи». В эпиневррии встречаются псевдокристаллы после элиминации шовного материала, макрофаги с псевдокристаллами после элиминации шовного материала и тканевым детритом.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счет бюджетного финансирования в соответствии с планом НИР, утвержденным МЗ СО в 2013–2016 гг.*

**Новикова Е.А.<sup>1</sup>, Сазонов С.В.<sup>1,2</sup>,  
Бриллиант А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

<sup>2</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

prof-ssazonov@yandex.ru

#### **ЭКСПРЕССИЯ ЯДЕРНОГО ФЕРМЕНТА ТОПОИЗОМЕРАЗА II АЛЬФА И РАЗМЕР ПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

В модели карциномы молочной железы (КМЖ) изучалась взаимосвязь уровней экспрессии ядерного фермента топоизомеразы-II альфа, состояния пролиферативных процессов и размеров популяции опухолевых стволовых клеток в молекулярно-генетических подтипах карциномы молочной железы. Материалом для исследования послужили ткани опухоли 691 пациентки. Материал исследовался гистологическим, иммуногистохимическим и статистическими методами. При оценке достоверности различия среднего уровня экспрессии топоизомеразы-II альфа (TOP2A) установлено, что в подтипах люминального А, HER-2 позитивного, тройного негативного подтипа (ТН), среднее значение экспрессии достоверно отличается от значения всей выборки (Люминальный А — 6,74%:  $T = 8,2 > T_{кр} (= 1,96, p < 0,05)$ , люминальный В (Her-2 негативный) — 19,27%:  $T = 1,6 < T_{кр} (1,96, p < 0,05)$ , люминальный В (Her-2 позитивный) — 19,46%:  $T = 1 < T_{кр} (1,96, p < 0,05)$ ), HER-2 позитивный подтип — 21,4%:  $T = 2,2 > T_{кр} (= 1,96, p < 0,05)$ , ТН подтип — 27,79%:  $T = 6,7 > T_{кр} (1,96, p < 0,05)$ ). Полученные закономерности связаны с особенностью коэкспрессии Ki-67 и TOP2A. Ki-67 и TOP2A экспрессируются в одни и те же фазы клеточного цикла (G2, M), экспрессия TOP2A зависит от экспрессии Ki-67 тка-

ни КМЖ. Высокие значения пролиферации и уровня экспрессии TOP2A в HER-2 позитивном и ТН подтипах связаны с особенностью нарушения каскадных механизмов регуляции деления клетки. Внутриклеточные сигнальные пути Notch (активируются гены, регулирующие пролиферацию и апоптоз в клетках), Hedgehog (внутриклеточный путь эмбрионального развития, активирующий пролиферацию стволовых опухолевых клеток) и Wnt (внутриклеточный путь, регулирующий самообновление стволовых клеток и сохранение их в недифференцированном состоянии) участвуют в регуляции состояния пролиферативных процессов в тканях, физиологической и репаративной регенерации, играют ключевую роль во время эмбрионального развития тканей, а также причастны к увеличению количества стволовых опухолевых клеток (BCSC). Считается, что дисрегуляция путей Notch и Hedgehog приводит к появлению клеток с фенотипом BCSC. Обнаружено, что в большинстве случаев люминального А, люминального В и гормон-рецептор позитивного HER-2 позитивного подтипов КМЖ при достоверно более низких значениях пролиферации и экспрессии TOP2 не обнаружено опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH1A1 (фермент, появляющийся только в BCSC). При изучении гормон-рецептор негативного HER-2 позитивного и трижды негативного подтипов на фоне достоверного увеличения уровня пролиферации и экспрессии TOP2 в клетках опухоли выявлена экспрессия ALDH1A1 в 42% и 21% случаев КМЖ соответственно.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено в рамках НИР ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.*

**Гаранина Е.Е.<sup>1</sup>, Гатина Д.З.<sup>1</sup>, Мартынова Е.В.<sup>1</sup>,  
Хайбуллина С.Ф.<sup>2</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>,  
Салафутдинов И.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Университет штата Невада

sal.ilnur@gmail.com

#### **ИЗМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОМА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА НА ФОНЕ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**

В последнее десятилетие показано, что мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека могут быть использованы при терапии широкого круга заболеваний. При этом известно, что МККП человека представляют собой неоднородную гетерогенную популяцию клеток, включающую в себя лимфоциты, моноциты, стволовые клетки и ряд других клеточных типов. МККП человека способны дифференцироваться в различные клеточные типы, а также секретировать широкий диапазон ростовых и трофических факторов. Согласно последним данным, именно факторы, секретлируемые трансплантируемыми клетками обуславливают их терапевтическое воздействие за счет различных паракринных эффектов и активации естественных механизмов регенерации тканей. Кроме того, остается возможность *in vitro* дифференцировки трансплантируемых МККП в различные клетки организма за счет эффектов окружения и внутреннего клеточного потенциала. С целью повышения терапевтического эффекта трансплантируемых клеток предлагается их генетическая модификация различными генно-терапевтическими конструкциями. В данной работе мы прово-

дили оценку влияния трансдукции рекомбинантными аденовирусами на секрецию МККП человека цитокинов, хемокинов и факторов роста. С помощью градиентного центрифугирования из пуповинной крови человека были выделаны мононуклеарные клетки. Проведена трансдукция МККП человека аденовирусами, экспрессирующими ген сосудистого эндотелиального фактора роста человека (Ad5-VEGF) или усиленного зеленого флуоресцентного белка (Ad5-EGFP). Валидацию биосинтеза мРНК рекомбинантных генов VEGF и EGFP модифицированными МККП человека проводили с использованием ген специфических праймеров и проб TaqMan<sup>®</sup>. Анализ содержания 48 анализов в кондиционной среде, собранной с генетически модифицированных клеток, осуществляли с применением наборов Bio-PlexPro<sup>™</sup> HumanCytokine 21- и 27-plexAssay (BioRad) по технологии Luminex<sup>®</sup>xMAP. В ходе количественной ПЦР было установлено, что МККП, трансдуцированные Ad5-VEGF или Ad5-EGFP, повышают уровень экспрессии целевых генов в 1600 (VEGF) и 1000 (EGFP) раз, по сравнению с контролем (нативные клетки). При оценке секретомного профиля МККП было выявлено, что нативные клетки и клетки, трансдуцированные Ad-EGFP, имеют схожий профиль секреции анализируемых факторов. Клетки секретировали: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, PDGF-bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF, IL-1a, IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, STACK, GROa, HGF, IFN-a2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NGF, SCF, SCGF-b, SDF-1a, TNF-b, TRAIL. В то же время, как и ожидалось, клетки, трансдуцированные Ad-VEGF, имели повышенный уровень секреции VEGF, а также IL-8, IL-12, FGF-2, GM-CSF, IP-10, IL-2Ra, IL-3, IL-16, IL-18, STACK, GROa, IFN-a2, LIF, MCP-3, MIF, b-NGF, TRAIL по сравнению с контролями. Таким образом, мы предполагаем, что используя различные гены и их комбинации можно целенаправленно модулировать секретомный профиль клеток, задавая им необходимый терапевтический потенциал.

Финансирование исследования: *Данная работа выполнена при поддержке РФФИ 16-04-01567А.*

**Салафутдинов И.И.<sup>1</sup>, Журавлева М.Н.<sup>1</sup>,  
Гаранина Е.Е.<sup>1</sup>, Исламов Р.Р.<sup>2</sup>, Масгутов Р.Ф.<sup>3</sup>,  
Хайбуллина С.Ф.<sup>4</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

<sup>3</sup> ГАУЗ «Республиканская клиническая больница»

<sup>4</sup> Университет штата Невада

sal.ilnur@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ VEGF И FGF2, НА СЕКРЕТОМ КЛЕТКИ И ИНДУКЦИЮ АНГИОГЕНЕЗА**

В последние годы в повседневную медицинскую практику активно внедряются передовые методы лечения широкого круга заболеваний человека с применением различных генно-инженерных систем. На данный момент официально зарегистрирован ряд гено-терапевтических препаратов, которые нашли применение в клинической практике. Среди них препараты на основе плазмидных конструкции могут рассматриваться как наиболее безопасные,

простые в производстве и использовании. Нами на протяжении длительного времени проводятся работы по созданию тестированию, внедрению и оптимизации рекомбинантных двухкасетных плазмидных конструкций для стимуляции естественных процессов ангиогенеза и нейропротекции. В частности, нами созданы двухкасетные плазмидные вектора (pBud-VEGF165-FGF2) одновременно и независимо экспрессирующие два гена с выраженным проангиогенным потенциалом: сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165) и основного фактора роста фибробластов человека (FGF2). В представленном исследовании, с использованием технологии Luminex<sup>®</sup>xMAP и набора Bio-PlexPro<sup>™</sup> HumanCytokine 27-plexAssay (BioRad) было показано, что генетически модифицированные клетки линии HEK293 и стволовые клетки из жировой ткани (СКЖТ) человека, как и ожидалось, по сравнению с нативными клетками, сверх-экспрессируют VEGF и FGF2. Кроме того, имеют повышенный профиль секреции противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10), провоспалительных цитокинов (IL-12(p70), IFN-g, TNF-a), хемокинов (IL-8, IP-10, MCP-1) и факторов роста (GM-CSF, PDGF-bb). При моделировании ангиогенеза у крыс *in vivo* генетически модифицированные клетки в составе Матригеля (внеклеточный матрикс) на седьмой день после подкожного введения формировали зону с повышенной васкуляризацией по сравнению с контролем – нативными клетками. При этом была выявлена повышенная плотность сосудов окружающих тканью, развивающиеся сосуды имели более крупные размеры по сравнению с контролем. Кроме того, степень терапевтического воздействия рекомбинантной конструкции оценивали с помощью аппарата доплеровской лазерной диагностики EasyLDIMicrocirculationCamera на модели субкомпенсированного кровоснабжения при регенерации кожно-фасциального лоскута. Непосредственное введение плазмиды pBud-VEGF165-FGF2 по всей длине лоскута приводила к более ранней компенсации кровоснабжения, которая составила 55% по отношению к интактной коже. В то же время, в контрольной группе происходила декомпенсация микроциркуляции, составившая 10% по отношению к интактной коже. Таким образом, проведенные исследования позволяют говорить о том, что одно-временная сверх-экспрессия клетками VEGF и FGF2 *in vitro* изменяет профиль секреции целого ряда цитокинов, хемокинов и факторов роста. Рекомбинантная плазмидная конструкция способна участвовать в индукции ангиогенеза и оказывать выраженное стимулирующее влияние на процессы васкуляризации декомпенсированного кожно-фасциального лоскута, что может быть использовано при лечении длительно незаживающих ран различного генеза.

Финансирование исследования: *Данная работа частично поддержана грантом РФФИ 16-04-01567.*



**Салихова Т.И., Сираева З.Ю., Ергешов А.А.,  
Хозяинова С.А., Муллин Р.И., Абдуллин Т.И.**

*Казанский (Приволжский) федеральный  
университет*

taliya.salikhova@mail.ru

### **РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕЛЕВОЙ ФОРМЫ КРИПТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ИЗ КОЛЛАГЕНА**

Создание эффективных и доступных биоматериалов для регенерации поврежденных тканей остается одним из наиболее актуальных запросов современной медицины. В качестве структурной основы биоматериалов широко используют природные и синтетические полимеры, образующие гидрогели/ гидроколлоиды, способные создавать в ране влажную среду и доставлять биологически активные компоненты [1]. В работе исследована ранозаживляющая активность *in vivo* мягкой гелевой формы на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), содержащей препарат криптического пептида (КП). КП представляет собой фрагмент альфа-цепей коллагена и, по данным *in vitro* исследований, усиливает пролиферацию и биосинтетическую активность клеток млекопитающих, в том числе, фибробластов кожи человека [2]. Исследование проводили на модели эксцизионной раны кожи [3]. На депилированной межлопаточной области анестезированного животного симметрично вырезали два участка кожи диаметром 12 мм, вокруг которых с помощью скоб закрепляли силиконовые шины. На раневую поверхность наносили 200 мг геля, содержащего 2 мас.% КМЦ (контроль) и КМЦ с добавлением КП (опыт). Для предотвращения высыхания рану покрывали адгезивной полиуретановой пленкой. Оценивали визуально скорость закрытия раны, а также отбирали тканевой материал в области раны для гистологического анализа. Установлено, что к 7 сут. скорость закрытия раны в опыте составила  $1,26 \pm 0,04$  мм/сут. (площадь закрытия 73,5%), что в 1,6 раза выше, чем в контроле ( $0,78 \pm 0,08$  мм/сут. и 45,5% соответственно). В опытной группе выявлены существенно меньшая инфильтрация формирующейся грануляционной ткани лейкоцитами к 3 сут. и практически полное отсутствие клеток воспалительного ответа к 5 сут., что позволяет предполагать ускоренное протекание воспалительной фазы процесса ранозаживления. При анализе препаратов, окрашенных методом Ван-Гизона, установлено, что под действием пептидного препарата к 7 сут. формируются коллаген и компоненты основного вещества, при этом новообразованная дерма имеет строение, типичное для нативной (неповрежденной) кожи. Полученные результаты свидетельствуют о выраженной ранозаживляющей активности КП из коллагена в составе КМЦ-содержащего геля при наружном применении, проявляющейся в ускоренном прохождении воспалительной фазы процесса, стимуляции пролиферации и синтетической активности фибробластов и, как следствие, в усиленном формировании дермы.

#### *Литература:*

1. Boateng J., Matthews K., Stevens H., Eccleston G. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review// J Pharm Sci., Vol.97(8), 2008, p. 2892-2893

2. Салихова Т. и др. Ранозаживляющая активность препарата на основе криптического пептида/ Салихова Т., Хозяинова С., Сираева З., Ергешов А., Закирова А., Муллин Р., Давлиев Д., Новиков Р., Абдуллин Т.// Научно-практическая

конференция с международным участием "Современные аспекты лечения термической травмы". – 2016. – с.97

З. А.А. Ергешов, З.Ю. Сираева, Р.Р. Казакова, Р.И. Муллин, Д.М. Давлиев, А.А. Закирова, Т.И. Салихова, Е.В. Кузнецова, Д.Т. Льюнг, И.Н. Савина, Т.И. Абдуллин. Влияние криогеля желатина на синтетическую активность и пролиферацию фибробластов в модели эксцизионной раны кожи // Гены и клетки, 2015

Финансирование исследования: 1. Государственная программа повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета (КФУ) среди ведущих мировых научно-образовательных центров, 2. Программа «УМНИК» Фонда содействия инновациям.

**Самойлова Е.М., Кальсин В.А.,  
Баклашев В.П.**

*ФГБУ Федеральный научно-клинический  
центр специализированных видов медицинской  
помощи ФМБА России*  
samoyket@gmail.com

### **РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В НЕЙРАЛЬНЫЕ С ПОМОЩЬЮ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ**

Генетическая нестабильность и потенциальная туморогенность iPSCs заставляет исследователей искать альтернативные более безопасные источники нейральных прогениторных клеток (НПК) для восстановления утраченных функций головного и спинного мозга альтернативных протоколов репрограммирования клеток. Одним из таких источников может быть трансдифференцировка соматических клеток в нейральные с помощью коктейля малых молекул. Среди малых молекул выделяют условно вспомогательные вещества, подготавливающие процесс трансдифференцировки, так и молекулы, заменяющие по результирующему эффекту некоторые транскрипционные факторы. Целью данного исследования является создание протокола репрограммирования мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга взрослого человека с помощью малых молекул для создания НПК. Для репрограммирования мМСК костного мозга и получения НПК был использован коктейль малых молекул, в который входили как «дестабилизирующие» молекулы, такие как ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие агенты, модуляторы цитоскелета, так и активаторы сигнальных путей (SHH). В результате были получены клетки, фенотипически соответствующие нейральным прогениторам, экспрессирующие SOX2, нестин, а также  $\beta$ III-тубулин, MAP2a и GFAP. Исходя из анализа литературы и собственных экспериментальных данных, обсуждаются возможные модификации протокола.

Финансирование исследования: Грант РНФ № 16-15-10432.

**Самчук Д.П.<sup>1</sup>, Алексеева О.Ю.<sup>1</sup>,  
Шаповалов Р.С.<sup>2</sup>, Кудинов В.А.<sup>1</sup>,  
Лаук-Дубицкий С.Е.<sup>3</sup>, Кызласов П.С.<sup>3</sup>,  
Сапрыкин В.П.<sup>3</sup>, Самчук П.М.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

<sup>2</sup> Филиал ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Вересаева ДЗМ»

<sup>3</sup> ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)  
denis.samchuk@gmail.com

### **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВЫХ ПОДХОДОВ К ОДНОЭТАПНОЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Межклеточные матриксы тканей человека и животных имеют преимущества перед биологическими и синтетическими полимерами, благодаря сложной макро- и микроархитектуре, так и комплексной биологической активности, повышенной при снижении возраста источника. При этом проявление терапевтических свойств матриксов зависит главным образом от того, насколько эффективно в процессе их обработки (т.н. децеллюляризации) были удалены факторы, провоцирующие профибротическую воспалительную реакцию: клетки; молекулы, ассоциированные с повреждением (DAMP) — ДНК и РНК, HMGB1 и др. Амниотическая мембрана (АМ) — легкодоступный, этичный, универсальный биоматериал. Однако эффективность традиционных методик ее децеллюляризации ограничена.

**ЦЕЛЬ.** Впервые испытать новые подходы одноэтапной обработки АМ с помощью 1,5% додецилсульфата натрия (SDS); 0,5% надуксусной кислоты (PAA); 4% Тритона X-100 (TNX) и сравнить с распространенной методикой, использующей 0,25% Трипсин — ЭДТА (Try).

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** После получения информированного согласия, из плацент (n = 2) после планового кесарева сечения изымались участки (АМ) размером 15,0×15,0 см и помещались в 50 мл транспортной среды с антибиотиками. В срок не позднее 4 ч. АМ разделялась на участки 2,0×2,0 см, которые подвергались однократной заморозке-оттаиванию при -20°C/+37°C. Затем, в зависимости от последующей обработки, материал подразделялся на контрольную и экспериментальные (TRY, SDS, PAA, TNX) группы. Время обработки TRY составляло 30 мин., остальных — 3 ч. при комнатной температуре и постоянном перемешивании растворов 200 об./мин. Затем образцы АМ фиксировались и окрашивались гематоксилин-эозином по стандартной методике.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В контрольных образцах по всей длине АМ располагался слой амниотических эпителиальных клеток (АЭК), клетки в подлежащем к компактному фибробластном слое (АМК). После обработки TRY наблюдалось полная децеллюляризация и разволокнение подлежащего фибробластного слоя с участками клеточного детрита в нем. В образцах SDS, также, как и TRY, наблюдалось отсутствие АЭК. В толще фибробластного слоя отмечались единичные участки размытого хроматина. В образцах PAA обнаружены очаговые участки обнаженной базальной мембраны и АМК в толще АМ. Образцы TNX не отличались от контроля.

**ВЫВОДЫ.** Несмотря на распространенность, применение трипсина сопровождается поврежде-

нием матрикса и сохранением клеточного дебриса. Мягкий детергент TNX показал отсутствие, а PAA-ограниченную пригодность для обработки АМ. Применение SDS в высокой концентрации (0,03% — 24 ч. по литературе) снижает время обработки матрикса, но не полностью удаляет хроматин из толщи АМ. Требуется дальнейшие исследования, так как биосовместимость АМ зависит от удаления клеточного детрита, контроля за содержанием ДНК и других молекулярных фрагментов повреждений.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счет собственных источников финансирования.*

**Свечникова Н.Н.**

«НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» — филиал ФГБНУ НИИ ИЦиГ СО РАН

n.svechnikova@ngs.ru

### **РЕПАРАЦИЯ РУБЦОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ПРЕПАРАТА КОЛЛАГЕНА КОЛЛОСТ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ** разработки препаратов, влияющих на восстановление коллагена кожи, определяется сложностью восстановления кожи при системных заболеваниях, ожогах, хирургических вмешательствах, возрастных изменениях. Некоторые системные заболевания, сопровождающиеся распадом глубоких слоев дермы, заканчивающихся рубцовыми изменениями кожи. В косметологии для репарации соединительнотканых структур при рубцовых изменениях кожи применяют препараты коллагена. В литературе отражены лишь немногочисленные результаты исследований формирования соединительной ткани и тканевых реакций после имплантации биодеградирующего материала на основе коллагена.

Системные заболевания, сопровождающиеся распадом глубоких слоев дермы, также сопровождаются рубцовыми изменениями кожи. Репарация таких рубцов возможна при применении препаратов коллагена, не вызывающих нежелательных явлений.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Изучение динамики репаративных процессов в рубцовой ткани кожи при имплантации биодеградирующего материала на основе коллагена у больной панникулитом Ротмана-Макаи.

**МЕТОДЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.** Для оценки поражения кожи биоптат фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере, обезживали. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Романовскому и по Ван-Гизону, изучали на световом микроскопе Triton при увеличении до 2500 раз.

Метод клинического наблюдения включал оценку динамики состояния рубцов и субъективных ощущений у больной Е. 27 лет, наблюдавшейся в связи с панникулитом Ротмана-Макаи, протекающим с образованием на коже лица узлов, последующим их распадом и рубцеванием язв. В области подбородка рубец оказался спаян с костью, что определило сложность в заполнении дефекта в связи с особенностью поражения подкожно-жировой ткани.

**ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.** Терапию рубцовых изменений кожи лица проводили препаратом коллагена коллост в виде 7% геля, вводимый эндолимфатически.

Для заполнения дефекта в области подбородка использовали имплантацию коллостом в виде 15% геля. Коллост вводили после аллергопробы по ходу

рубцов и в лимфатические пространства между рубцами и костной тканью на подбородке. Уже после 1 процедуры рубцы стали более мягкими, чувство стягивания кожи уменьшилось. Для достижения хорошего результата потребовалось 10 процедур, после которых рубцы не только уменьшились в размерах, но и уплостились до уровня нормальной кожи. Остаточными явлениями были полосы, лишённые пигмента. Для восстановления формы подбородка дополнительно провели 5 имплантаций 15% геля коллост, после которых дефект не только кожи, но и формы подбородка резко уменьшился.

**ВЫВОДЫ.** Репарация соединительнотканых структур кожи при имплантации коллостом в виде 15% геля сопровождалась уменьшением косметического дефекта и восстановлением функции кожи без хирургического вмешательства.

**Сатаева Т.П., Заднипрный И.В.**

*Крымский федеральный университет  
им. В.И. Вернадского  
tanzcool@online.ua*

**РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ЭФФЕКТ МАКРОФАГОВ  
ФЕНОТИПА M2 НА ПРИМЕРЕ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ  
НЕФРОПАТИИ**

Известно, что макрофаги, в зависимости от клеточных сигналов, могут приобретать классический фенотип M1 или альтернативный M2. Факторы, влияющие на этот процесс, представляют интерес для современной иммунологии. Макрофаги, которые обладают противовоспалительными и регенераторными свойствами, принято определять фенотипом M2. В настоящее время идет поиск безопасных путей *in vivo* репрограммирования провоспалительного фенотипа M1 в M2. Одним из таких способов может явиться применение иммуномодуляторов, содержащих биологически активные пептиды. В качестве активаторов пула прорегенераторных макрофагов M2 в эксперименте была использована комбинация иммуномодуляторов класса Эрбисол по определенной схеме, что позволяет последовательно провести иммунокоррекцию и иммуномодуляцию. Выбранные препараты представляют собой концентраты, полученные из куриной эмбриональной ткани и содержащие комплекс природных белковых и небелковых низкомолекулярных органических соединений негормонального происхождения, включающие специфические мембранные гликопротеины — маркеры физиологического состояния клеток, определяющие иммуногенные свойства тканей. В рамках исследования были изучены структурные преобразования паренхимы и стромы почки в условиях алкогольной интоксикации с последующей иммуномодуляцией. В эксперименте были использованы 62 беспородные трехмесячные крысы обоего пола, массой 220–310 г, которых после односторонней нефрэктомии подвергали двухмесячной алкоголизации 40% этанолом с последующей его отменой. Животные были разделены на следующие группы: I группа (n = 30) — коррекция после отмены этанола не проводилась; II группа (n = 32) — коррекцию после отмены этанола проводилась препаратами Эрбисол и Экстра Эрбисол по схеме из расчета 0,02 мл на 10 г массы тела в течении 22 сут. После введения 40% этанола в I группе наблюдалось резкое, практически необратимое замедление компенсаторной гипертрофии

почки, которая сопровождалась дистрофией канальцевых эпителиоцитов и выраженным интерстициальным фиброгенезом в местах лимфоцитарно-M1 макрофагальной инфильтрации (CD 80). В эти же сроки степень компенсаторной гипертрофии сосудистых клубочков нефрона при введении препаратов класса Эрбисол во II группе по данным морфометрии превышала таковую в первой группе в 1,5–2,3 раза. Во II группе также отмечались более выраженные явления регенерации, что проявлялось в увеличении синтеза белка клетками стромы и паренхимы, возрастании морфометрических показателей площади элементов коркового вещества, увеличении количества макрофагов фенотипа M2 (CD 163) в перитубулярных зонах на фоне уменьшения числа дистрофически поврежденных эпителиоцитов и коллагеновых волокон. Очевидно, что в основе механизма действия иммуномодуляторов лежит повышение цитокинпродуцирующей способности макрофагов и T-лимфоцитов хелперов 2 типа, активирующих M2 макрофаги. Таким образом, низкомолекулярные органические иммуномодуляторы способствуют выраженной компенсаторной гипертрофии поврежденной почки за счет регенераторных эффектов цитокинов макрофагов M2.

**Селезнева И.И.<sup>1</sup>, Ермаков А.М.<sup>1</sup>,  
Зайцев В.В.<sup>2</sup>, Сурменев Р.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*

<sup>3</sup> *Национальный исследовательский Томский политехнический университет  
selezneva\_i@mail.ru*

**ПОРИСТЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И НАНОЧАСТИЦ  
МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА  
ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ  
КОСТНЫХ ТКАНЕЙ**

Поликапролактон (ПКЛ) обладает высокой биосовместимостью и способностью к биодеградации без образования токсичных продуктов распада, что открывает перспективы его применения в регенеративной медицине в качестве матрикса для тканевой инженерии. Однако из-за гидрофобной природы и отсутствия биоактивных функциональных групп ПКЛ недостаточно благоприятен для роста клеточных культур, что затрудняет применение этого материала в тканевой инженерии. Одним из подходов, связанных с улучшением биоактивных свойств матриксов ПКЛ является их импрегнирование кальций-фосфатными наночастицами (КФ), способствующими адгезии, пролиферации и остеогенной дифференцировке стволовых клеток. Наиболее перспективными в этом отношении являются наночастицы замещенного гидроксиапатита, увеличивающие скорость остеointеграции и остеогенеза в сравнении с чистым аналогом. В данной работе были исследованы образцы микропористых матриксов, сформированных методом электроформования из поликапролактона (ПКЛ) с добавлением наночастиц гидроксиапатита (ГА), кремний-замещенного гидроксиапатита (Si-ГА) и гидроксиапатита со стронцием (Sr-ГА). Установлено, что использование наночастиц в процессе электроформования полимерных ПКЛ скаффолдов

позволяет значительно увеличить их пористость и создать бикомпонентную структуру. Результаты исследования жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток человека при культивировании на поверхности гибридных скаффолдов, свидетельствуют о высокой биосовместимости всех матриц. Введение наночастиц GA, Si-GA и Sr-GA модифицирует поверхность полимерных материалов, обеспечивая лучшие условия для адгезии и распластывания клеток и снижая пролиферативную активность клеток на поверхности материалов по сравнению с контролем. При этом снижение пролиферативной активности более полно выражено на поверхности материалов с перекрестной структурой, модифицированных включением Si-GA и Sr-GA. При гистологическом исследовании было выявлено, что в случае чистого ПКЛ матрикса наблюдалось слабое врастание собственной соединительной ткани по краю без проникновения в толщу образца. Импрегнация в матрикс ПКЛ наночастиц фосфатов кальция способствует врастанию собственной соединительной ткани в толщу образца, что свидетельствует о выраженном процессе биоинтеграции матрикса. Кроме того, в отличие от матриц из чистого ПКЛ, где единичные новообразованные кровеносные сосуды встречаются только по краю контакта с образцом, в композитном матриксе они присутствуют и на некотором удалении от края контакта, что говорит о повышении биоинтегративных свойств данных материалов. Проведено исследование изменения профиля экспрессии 22 генов-маркеров дифференцировки с использованием клеток МСК при культивировании на поверхности исследуемых материалов. Установлено, что, несмотря на схожесть общей картины экспрессии генов, указывающей на направленность дифференцировки клеток по типу остеогенеза, различия в химическом составе и микроструктуре поверхности материалов определяют разницу в степени активации экспрессии генов-маркеров дифференцировки. Таким образом, биосовместимые, биодеградируемые композитные микропористые матриксы на основе поликапролактона и наночастиц замещенного гидроксипата могут быть использованы в изготовлении конструкций для восстановления дефектов костных тканей в организме пациента.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (номер соглашения 14.610.21.0015).*

**Селенина А.В.<sup>1</sup>, Синенко С.А.<sup>1</sup>, Зайферт У.<sup>2</sup>, Томилин А.Н.<sup>1</sup>, Цимоха А.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Грайфсвальдский университет  
a.selenina@incras.ru

### **РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют собой не только интересные объекты фундаментальных исследований, но также крайне перспективны для различных прикладных областей медицины, регенеративной медицины. Хотя существует большой интерес к плюрипотентным клеткам, механизмы поддержания в них белкового гомеоста-

за с помощью убиквитин-протеасомной системы изучены крайне слабо. Считается, что посредством пост-трансляционных модификаций белков и их деградации в протеазных комплексах — протеасомах — убиквитин-протеасомная система контролирует практически все основные клеточные процессы. Протеасома состоит из коровой 20S и одной или двух регуляторных 19S частиц. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы 20S коровой частицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  могут замещаться на особые субъединицы —  $\beta 1i/LMP2$ ,  $\beta 2i/MECL-1$  и  $\beta 5i/LMP7$ . Существует также дополнительный регулятор конститутивной и иммунопротеасомы — PA28, который увеличивает эффективность деградации белков. Роль иммунопротеасом в процессе получения иПСК исследована крайне мало. Чтобы приблизиться к решению данной проблемы, в данной работе мы индуцировали репрограммирование мышинных эмбриональных фибробластов в иПСК с помощью лентивирусов, кодирующих полицистронную последовательность факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Мы показали, что в течение всего процесса репрограммирования под действием селективного ингибитора иммуносубъединицы LMP7 протеасом PR-957 и ингибитором широкого действия — MG-132 наблюдается заметное снижение образования клонов иПСК, что говорит об участии не только протеасом, но и иммунопротеасом в процессе репрограммирования. Анализ репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов, полученных из нокаутных эмбрионов по MECL-1 и PA28 $\alpha/\beta$ , также показал сильное снижение в образовании клонов иПСК, что свидетельствует об участии протеасом, иммунопротеасом и регуляторной частицы PA28 в процессе репрограммирования и образовании иПСК. Наше исследование роли и механизмов работы убиквитин-протеасомной системы в плюрипотентных клетках позволит не только лучше понять их биологию, но также ляжет в основу разработки новых подходов в регенеративной медицине.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (16-14-10343).*

**Семенова Д.С.<sup>1,2</sup>, Малашичева А.Б.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России  
daria.semenova1994@gmail.com

### **ДОЗАЗВИСИМАЯ РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Сигнальный путь Notch участвует в обеспечении межклеточных коммуникаций, играя значительную роль в ходе развития многих систем органов и тканей. В частности, регуляция остеогенной дифференцировки клеток во многом находится под контролем Notch. По данным разных исследований, активация этого сигнального пути может приводить как к усилению, так и к подавлению остеогенной дифференцировки, и, таким образом, роль Notch в запуске дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) остается неясной. Целью данной работы было изучить влияние нескольких различных компонентов

сигнального пути Notch, а также влияние различных доз этих компонентов на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека. В работе использованы МСК жировой ткани человека. Остеогенную дифференцировку МСК запускали при помощи добавления в среду для культивирования специфических индукторов. Эффективность дифференцировки оценивали при помощи анализа экспрессии остео-маркеров методом ПЦР в реальном времени, а также путем окрашивания клеточных культур ализариновым красным на отложения фосфатов кальция. Notch активировали, вводя в клетки один из четырёх компонентов сигнального пути: Dll4, Jag1 (лиганды), Maml1 (транскрипционный фактор), NICD (Notchintracellular domain, активированный внутриклеточный домен Notch1) при помощи лентивирусных конструкций. Для изучения влияния межклеточных взаимодействий на эффективность остеогенной дифференцировки использовали два варианта культивирования клеток. В первом вводили лентивирусные частицы, несущие гены, кодирующие тот или иной компонент Notch, непосредственно в клетки, после чего запускали дифференцировку. Во втором варианте клетки трансдуцировали, а затем со-культивировали с клетками, не несущими генетической модификации, в которых сигнальный путь еще не был индуцирован. Мы показали, что факторы Maml1 и Dll4 не влияли на остеогенную дифференцировку МСК. В то же время, введение Jag1, либо NICD дозо-зависимо усиливало индукцию остеогенной дифференцировки. Тем не менее, чрезмерная активация сигналинга приводила к апоптозу. Межклеточные взаимодействия усиливали эффективность остеогенной дифференцировки. Полученные в данной работе результаты говорят о тканеспецифичном действии разных компонентов семейства Notch, а также о его способности модулировать остеогенную дифференцировку, влияя на ее эффективность за счёт силы сигнала, который передается клеткам.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ 17-04-01318.*

**Семина Е.В., Климович П.С., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А.**

Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
e-semina@yandex.ru

#### **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОНИЖЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ДМСО В СРЕДЕ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ, ПРОЛИФЕРАЦИЮ И СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) присутствуют во всех органах взрослого организма и могут быть выделены и культивированы *in vitro*. МСК, выделяемые из жировой ткани, благодаря относительной лёгкости получения и культивирования, высокой пролиферации и дифференцировке в разные типы клеток, а также иммуномодулирующим свойствам и секреции факторов роста и цитокинов, являются перспективным средством для стимуляции ангио- и нейрогенеза, остеогенеза, а также для лечения повреждений кожных покровов и ран. Среди многих возможных механизмов участия МСК в процессах регенерации ключевым считается их паракринная активность. Для использования в терапевтических це-

лях, МСК выделяют из жировой ткани и культивируют для получения в нужном количестве. Некоторые методы лечения требуют многократного введения МСК, что предполагает их криоконсервацию. Очевидно, что для криохранения МСК необходима разработка и оптимизация протоколов криоконсервации, которая должна быть направлена на увеличение выживаемости клеток МСК и сохранение их секреторного профиля, пролиферативной активности и способности к дифференцировке. В настоящее время одним из наиболее часто применяемых криопротекторов является диметилсульфоксид (ДМСО), однако в литературе накапливаются данные о высокой токсичности 10% ДМСО в составе криосред, разрабатываемых для терапевтического использования, прежде всего, из-за высокого содержания примесей (диметилсульфида и сульфонов), являющихся токсичными для МСК. Мы предположили, что использование более низких концентраций ДМСО не будет существенно снижать криопротекторные свойства, однако позволит максимально сохранить секреторную активность и другие характеристики, определяющие высокий регенеративный потенциал МСК. В нашей работе были протестированы среды с разным содержанием ДМСО и выбран оптимальный состав, сохраняющий свойства МСК. Было обнаружено, что выживаемость и пролиферация МСК выше при криоконсервации их в 5% ДМСО по сравнению с 10% ДМСО. Более того, при анализе секрета оказалось, что МСК, прошедшие этап криоконсервации в среде с 5% ДМСО, секретуют больше ангиогенных (VEGF, HGF, и Ang-1) и нейротрофных (GDNF и BDNF) факторов, чем при криоконсервации их в 10% ДМСО. Таким образом, мы показали, что для криоконсервации МСК оптимально использование 5% ДМСО, так как это позволяет не только сохранить жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, но и получить после разморозки популяцию МСК, функциональные характеристики которой соответствуют незамороженной популяции. Рекомендованный нами состав среды может быть использован для разработки лабораторных протоколов криоконсервации МСК для последующего применения в клинике.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) с использованием биоматериала собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФИ № 14-50-00029.*

**Рысенкова К.Д.<sup>1</sup>, Шмакова А.А.<sup>1</sup>, Семина Е.В.<sup>1,2</sup>, Рубина К.А.<sup>1</sup>, Карагяур М.Н.<sup>3</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>1</sup>, Дыйканов Д.Т.<sup>1</sup>, Ткачук В.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России

<sup>3</sup> Институт регенеративной медицины

МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

e-semina@yandex.ru

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ВЫКЛЮЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В НЕЙРОБЛАСТОМЕ**

Компоненты урокиназной системы — активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), урокиназный рецептор (uPAR) и ингибиторы PAI-1 и PAI-2 — участвуют в формировании и регенерации сосудов и нервов. Сериновая протеаза uPA стимулирует миграцию эндотелиальных клеток и рост аксонов по-

средством двух взаимодополняющих механизмов. Во-первых, uPA расщепляет белки внеклеточного матрикса, высвобождая про-ангиогенные и нейротрофные факторы (фактор роста фибробластов bFGF, сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF, мозговой нейротрофический фактор BDNF). Во-вторых, связываясь с uPAR на поверхности клеток, uPA запускает внутриклеточную сигнализацию с участием киназы фокальных контактов FAK, Ras/MAPK сигнального пути, киназы Akt, а также JAK/STAT сигнализации, приводящей к изменению в экспрессии генов, ответственных за пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток. uPA и uPAR вовлечены в процессы, связанные с ростом и инвазией опухоли, а также васкуляризацией первичного опухолевого узла. Антитела, специфичные к uPAR, полностью блокируют инвазию клеток глиомы U251 в тестах *in vitro*. Эти и другие результаты по блокированию и/или снижению экспрессии uPAR в опухолевых клетках легли в основу разработки перспективных подходов для ингибирования uPA/uPAR-зависимых путей опухолевого роста и метастазирования. Задачей данного исследования было создать подход для нокаутирования гена uPAR с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 в клетках нейробластомы Neuro2a и далее оценить их пролиферацию и активацию сигнального пути с участием митоген-активируемой киназы Akt. Клетки Neuro2a имеют полиплоидное ядро и содержат от 59 до 193 хромосом, поэтому для эффективного выключения экспрессии гена uPAR проводили три последовательные трансфекции плазмидами, содержащие гидовые РНК к гену uPAR, эндонуклеазу Cas9 и ген зелёного флуоресцентного белка EGFP. После каждого цикла трансфекции отбирали EGFP-позитивные субпопуляции, в которых далее оценивали экспрессию гена uPAR методами (1) ПЦР в режиме реального времени, (2) иммунофлуоресцентного окрашивания и (3) методом проточной цитометрии с помощью специфичных к uPAR антител. После третьей трансфекции было получено 30 клонов, у 10 из которых содержание белка uPAR было снижено, а в 2 клонках полностью отсутствовало по сравнению с исходным уровнем uPAR. Дальнейший анализ клеток с полным отсутствием экспрессии uPAR показал максимальное снижение пролиферации Neuro2a по сравнению с контрольными клетками с нативной экспрессией uPAR. При этом подавление пролиферации Neuro2a сопровождалось почти полным снижением уровня фосфорилирования киназы Akt (по Thr308), активация которого в клетках важна для поддержания их пролиферации и выживаемости. Таким образом, мы обнаружили, что выключение экспрессии uPAR с помощью CRISPR/Cas9 технологии в клетках нейробластомы представляет собой перспективную стратегию для изучения процессов онкогенеза, а также может служить в качестве терапевтического подхода для подавления пролиферации опухолевых клеток.

Финансирование исследования: *Грант Российской государственной академии наук (проект № 14-24-00086)* и *Грант Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00386)*.

**Семина Е.В., Рубина К.А., Ткачук В.А.**

*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова  
e-semina@yandex.ru*

### **УЧАСТИЕ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАЕКТОРИИ РОСТА АКСОНОВ**

Урокиназа (uPA) и урокиназный рецептор (uPAR) являются компонентами фибринолитической системы и играют важную роль в активации плазминогена и запуске каскада протеолиза, сопровождаемого деградацией внеклеточного матрикса, активацией матриксных металлопротеиназ и факторов роста. Связываясь на поверхности клеток со своим специфичным рецептором uPAR, урокиназа активирует внутриклеточную сигнализацию, стимулируя пролиферацию и направленную миграцию клеток. Направленность этих процессов обусловлена особенностями структуры uPAR, который не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов, и закреплён на мембране через гликозилфосфатидилинозитольный якорь. Такие особенности в строении uPAR обеспечивают его высокую латеральную подвижность на мембране и взаимодействие с различными рецепторами, в том числе с навигационными, которые регулируют направленный рост нервов. Несмотря на данные, свидетельствующие о вовлеченности урокиназной системы в регенерации нервов, роль uPA и её рецептора uPAR в регуляции направленного роста нервов до конца не ясна. Изучая навигационные свойства урокиназной системы, мы обнаружили, что uPA и uPAR экспрессируются в нейроне как в теле, так и на конусе растущих аксонов, причём на конусе роста аксона наблюдается со-локализация uPA и uPAR. Далее, на эксплантной модели *ex vivo* спинального ганглия (СГ) мыши мы обнаружили, что ингибирование протеолитической активности uPA достоверно подавляет миграцию нейральных клеток из эксплантов СГ в Матригель, а также существенно снижает скорость роста аксонов, что позволяет предположить о важной роли урокиназной системы в этих процессах. По-видимому, эти эффекты uPA реализуются при взаимодействии с uPAR, так как блокирование взаимодействия uPA с uPAR антителами к uPAR изменяет траекторию роста аксонов и усиливает их ветвление, а кроме того, снижает миграцию нейральных клеток из СГ в Матригель. При этом одновременное блокирование uPA и uPAR практически полностью подавляет рост аксонов из эксплантов СГ в Матригель. Данные, полученные на культуре Neuro2a *in vitro*, подтверждают результаты *ex vivo*: экзогенное введение uPA в среду культивирования дифференцированных в нейрональном направлении клеток нейробластомы мыши (Neuro2a) стимулирует рост нейритов, а ингибирование uPA полностью подавляет формирование и рост нейритов. Блокирование uPAR стимулирует образование нейритов *de novo* и усиливает ветвление уже сформированных нейритов. Таким образом, нами было впервые показано, что урокиназная система вовлечена в регуляцию роста и ветвления аксонов и миграцию нервных клеток. Активация урокиназной системы при восстановлении сосудов и нервов на сегодняшний день рассматривается как одно из главных звеньев при репарации органов и тканей. Развитие регенеративной медицины делает актуальными дальнейшие исследования uPA и uPAR в качестве новых подходов

для стимуляции эндогенной регенерации нервов, а также в качестве потенциальных мишеней при лечении неврологических расстройств.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счёт средств Гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086).*

**Сеничкин В.В.<sup>1</sup>, Копейна Г.С.<sup>1</sup>, Лаврик И.Н.<sup>2</sup>, Животовский Б.Д.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg

<sup>3</sup> Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology, Karolinska Institutet, Stockholm  
slsenichkin@gmail.com

### **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ УСИЛИВАЕТ ЦИСПЛАТИН-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОГРАММИРУЕМУЮ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НЕЗАВИСИМО ОТ АУТОФАГИИ**

Апоптоз и аутофагия — процессы программируемой клеточной гибели, необходимые для эмбриогенеза, обновления тканей взрослого организма и созревании клеток иммунной системы. Удаляя поврежденные клетки, оба процесса принимают участие в контроле канцерогенеза и терапии опухолей. Действие большого числа противоопухолевых препаратов основано на их способности запускать различные типы гибели раковых клеток. В настоящее время активно изучают комбинированные подходы для увеличения эффективности противоопухолевой терапии. Одним из перспективных подходов является комбинирование химиотерапевтических препаратов с контролируемым ограничением питательных веществ. Культивирование клеток *in vitro* в среде без сыворотки позволяет имитировать умеренное ограничение питательных веществ *in vivo*, так как снижает доступность белков (как источника аминокислот) и ростовых факторов в культуральной среде. В рамках данного исследования изучалось влияние культивирования опухолевых клеток в бессывороточной среде на процесс гибели, индуцированный химиотерапевтическим препаратом цисплатином. Результаты работы показали, что инкубация клеток линий карциномы яичника Caov-4 и рака эпителия шейки матки HeLa в бессывороточной среде усиливала цитотоксическое действие цисплатина. Так как уменьшение доступности белков и ростовых факторов может вести к запуску аутофагии, в качестве одного из возможных механизмов наблюдаемого феномена был изучен вклад этого процесса. Нами показано, что удаление сыворотки из среды индуцировало процессы аутофагии в раковых клетках, однако их стимуляция происходила позже, нежели запуск механизмов, ответственных за усиление цисплатин-индуцируемого апоптоза в бессывороточной среде. Необходимо отметить, что ингибирование аутофагии не влияло на уровень программируемой гибели раковых клеток и не приводило к снижению чувствительности раковых клеток к цисплатину в бессывороточной среде. Таким образом, результаты исследований продемонстрировали, что удаление сыворотки из среды как источника белков и ростовых факторов приводило к увеличению чувствительности раковых клеток к химиотерапевтическому препарату по независимому от аутофагии механизму.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 14-25-00056П.*

**Сергеев В.Г., Чучков В.М., Заколюкина Е.С.**

Удмуртский государственный университет  
cellbio@ya.ru

### **ВЛИЯНИЕ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ИНДУЦИРОВАНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В СОСУДИСТОМ СПЛЕТЕНИИ МОЗГА**

У взрослых млекопитающих, в физиологических условиях, процессы генерации новых функциональных нейронов из клеток-предшественниц, наблюдаются главным образом в двух областях мозга: субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа и субвентрикулярной зоне, примыкающей к стенкам боковых желудочков мозга. Однако, в патологических условиях, например, при инсульте, нейральные предшественники могут образовываться в сосудистом сплетении — сосудисто-эпителиальном производном мягкой мозговой оболочки, расположенной в желудочках головного мозга. Относительная автономность этой структуры от паренхимы мозга позволяет рассматривать ее в качестве удобного источника новообразующихся нервных клеток при разработке заместительной терапии функциональных или дегенеративных повреждений нервной ткани. Актуальное моделирование условий *in vivo*, стимулирующих образование нейральных предшественников в сосудистом сплетении без действия на нервную ткань повреждающих факторов, что наблюдается при инсульте. Известно, что инсульт индуцирует нейровоспаление. Однако известно, что провоспалительные факторы (цитокины, свободнорадикальные производные кислорода и азота и др.) в значительной мере ингибируют нейрогенез. Этот эффект противоречит описанному выше феномену индукции образования нейрогенных предшественников при инсульте. Для разрешения этого противоречия мы выполнили работу по моделированию нейровоспаления различной интенсивности, положив в основу гипотезу о двух фазах нейровоспалительного процесса, условно назвав их «репаративная» и «деструктивная». Каждая из них характеризуется соответствующим спектром синтезируемых глиальными клетками факторов (противо- и провоспалительных, соответственно). При помощи иммуногистохимического метода исследовали локализацию и количество нестин-экспрессирующих клеток в сосудистом сплетении (нейральные предшественники) и интенсивность экспрессии BDNF и индуцибельной нитроксидсинтазы (iNOS) в микро-и астроглии через 8 недель после стереотаксического введения малой и большой доз эндотоксина (ЛПС) в паренхиму мозга (область черной субстанции) и желудочки мозга. Введение малой дозы интенсифицировало производство BDNF в астроцитах (GFAP-иммунопозитивные клетки), тогда как большая доза ЛПС индуцировала в CD11b позитивных клетках (микроглиоцитах) значительную экспрессию iNOS. Введение ЛПС индуцировало появление в сосудистом сплетении нестин-экспрессирующих клеток. Описание гистотопографии этих клеток может свидетельствовать об интенсификации в условиях эндотоксиновой стимуляции миграционной активности нейральных предшественников из сосудистого русла в подependимальный слой субвентрикулярной зоны.

Описанная нами двуфазность реакции при моделировании локального нейровоспаления в паренхиме мозга позволяет предположить, что появление в сосудистом сплетении нейтральных предшественников может индуцироваться под действием астроглиальных ростовых факторов «репаративной» фазы воспаления.

**Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Каралкин П.А.**

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России  
prognoz.01@mail.ru

### **ОТ АЛЛОГЕННЫХ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ К 3D ПРИНТИНГУ: МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO, РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ IN VIVO**

В сообщении будут представлены как результаты собственных исследований, так и обзор современных трендов в реконструкции костно-хрящевых дефектов. Использование кальций-фосфатных материалов разного химического и фазового состава для заполнения костных дефектов исторически лежит в основе этого направления медицинского материаловедения и обосновано близостью состава кальций-фосфатной керамики к минеральному компоненту костной ткани. Основной биологической проблемой этого класса биоматериалов является низкая скорость их биорезорбции. Это потребовало разработки технологий создания пористых материалов. Одним из наиболее распространенных подходов является выжигание органических компонентов из неорганических скаффолдов. Однако эта техника не позволяет создать материалы со взаимосвязанными порами нужных размеров и геометрии. Способы протравливания поверхности кальций-фосфатных материалов, получаемых из нанопорошков как по керамической, так и по цементной технологиям, привели к получению имплантатов с развитой шероховатой поверхностью и, как следствие, с высокой адгезивностью для клеток и сорбционной емкостью для белков и биологически активных веществ. Таким образом, была сформирована платформа для создания функционально-ориентированных биоинженерных конструкций, содержащих, кроме неорганической составляющей, клетки, лекарства, факторы роста и другие биологически активные вещества. Применение 3D принтинга для изготовления костных имплантатов с учетом знаний о составе костной ткани как полимер-неорганическом композите, закономерно привело к использованию, наряду с кальций-фосфатным компонентом, и резорбируемой органической составляющей. В этом аспекте был апробирован целый спектр белковых и углеводных полимеров (природного или синтетического происхождения): гидрогели на основе коллагена, желатина, производные гиалуроновой кислоты, полилактиды, полилактогликолиды, хитозаны и др. Технология 3D принтинга действительно позволила получать скаффолды и тканеинженерные конструкции заданной геометрии, с развитой поверхностью, взаимосвязанной пористостью. В то же время, используемые сегодня в 3D принтинге органические компоненты хотя и подвергаются резорбции, однако при биоутилизации не способствуют остеогенезу, что зачастую приводит

к формированию на их месте не костной, а собственной соединительной ткани. Поиск новых составов органических компонентов, обеспечивающих адекватный сценарий ремоделирования 3D-композиционных имплантатов в зоне костного дефекта, остается актуальной задачей.

Финансирование исследования: *Соглашение № 14.604.21.0132 с Минобрнауки России (RFMEFI60414X0132).*

**Сергеева О.В.<sup>1</sup>, Курочкин И.И.<sup>1</sup>,  
Малявко А.Н.<sup>2</sup>, Зацепин Т.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологии  
<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова  
o.sergeeva@skoltech.ru

### **ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК LL35 ЯВЛЯЕТСЯ НОВЫМ РЕГУЛЯТОРОМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕЧЕНИ МЫШИ**

Открытие и изучение новых некодирующих РНК является одним из динамично развивающихся направлений молекулярной биологии. Накопленные научные знания свидетельствуют об участии днРНК в различных биологических процессах, включая иммунный ответ, клеточное деление и дифференцировку. Известно, что днРНК человека DEANR1 участвует в регулировании дифференцировки эндотермы в эмбриональных стволовых клетках человека. DEANR1 способствует связыванию SMAD2/3 белков с промоторной областью Foxa2, что приводит к активации транскрипции Foxa2 (W. Jianget al., 2015). Транскрипционный фактор Foxa2 необходим для развития печени из энтодермы (C. Leeetal, 2005). Кроме того, Foxa2 является транскрипционным активатором печень-специфических генов альбумина и трансферрина и играет важную роль в гомеостазе глюкозы в печени (K. Kaestner et al., 1994). При анализе геномного окружения фактора Foxa2 в геноме мыши, нами был обнаружен потенциальный гомолог днРНК DEANR1 – РНК LL35. Можно предположить, что днРНК LL35 участвует в регуляции транскрипции фактора Foxa2 в печени, и, как следствие, может оказать влияние на метаболические процессы и различные заболевания печени. Таким образом, целью данного проекта является изучение роли днРНК LL35 in vitro и in vivo, а результаты данной работы позволят оценить потенциальную терапевтическую и диагностическую значимость ее гомолога в человеке DEANR1 in vivo. Первым этапом данной работы был биоинформатический анализ представленности транскриптов днРНК в печени мыши. После чего был проведен дизайн и синтез синтетических модифицированных миРНК для получения нокдауна РНК LL35 методом РНК-интерференции в клетках гепатомы мыши Нера1-6. В результате был отобран набор миРНК, ингибирующий все экзоны днРНК LL35, представленные в печени мыши, определена их ингибирующая концентрация и начато изучение фенотипа клеток со сниженной экспрессией днРНК LL35.

Финансирование исследования: *РНФ 17-74-10140.*



**Серов О.Л.<sup>1,2</sup>, Кораблев А.Н.<sup>1,2</sup>, Серова И.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> НИИ медицинской генетики

serov@bionet.nsc.ru

**ГЕНЕРИРОВАНИЕ МЕГАБАЗНЫХ ДЕЛЕЦИЙ, ДУПЛИКАЦИЙ И ИНВЕРСИЙ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ГЕН CNTN6, У МЫШЕЙ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ НЕЙРО-ПСИХИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ МАСШТАБНЫМИ ХРОМОСОМНЫМИ ПЕРЕСТРОЙКАМИ**

Варьирование числа копий (CNV) гена CNTN6 (кодирует белок контактин-6) человека, вызванных масштабными делециями или дупликациями, являются причиной тяжелых нейро-психических заболеваний (неспецифическая умственная отсталость, аутизм, сниженное внимание), нередко сопровождающиеся фасциальными дисморфозами. В противоположность эффектам хромосомных перестроек, точковые мутации гена CNTN6 человека (сдвиг рамки считывания, отсутствие стартового или стоп-кодона и другие) не имеют каких либо клинических проявлений и встречаются как редкие мутации. Уместно также отметить, что мыши гомозиготные по нокаутным мутациям гена CNTN6 жизнеспособны и фертильны, хотя отмечается снижение звукового порога при аудиогенных припадках. Это стимулировало нас создать мышей, несущих масштабные делеции, дупликации и инверсии с вовлечением только гена CNTN6, как более адекватную модель CNV этого гена у человека, чем нокаутные мыши. Мы использовали CRISPR/Cas9 технологию для получения мегабазных хромосомных перестроек в хромосоме 6 с вовлечением гена CNTN6. Прямое инъектирование gRNA (фланкирующие фрагмент ДНК (размером 1137 т.п.о.) вместе с мРНК Cas9 и ssODN в цитоплазму 599 зигот мышей, из них 256 жизнеспособных было трансплантировано в яйцеводы приемным матерям. Мы наблюдали рождение 41 потомка и по результатам ПЦР анализа и секвенирования продуктов ПЦР удалось идентифицировать 7 потомков FO с делецией, 2 дупликацией и 4 с инверсией гена CNTN6. Интересно, что два животных имели одновременно делецию и дупликацию. Важно отметить, что из 7 носителей делеции, у трех обнаружены корректные ожидаемые последовательности в сайтах контактов таргетных сайтов. Таким образом, эффективность получения животных с делециями, дупликациями и инверсиями составляла примерно 25%. Важно, что все генетически модифицированные животные дали потомство, несущее индуцированные хромосомные перестройки хромосомы 6, то есть они стали основателями 11 линий мышей с адресными делециями, дупликациями и инверсиями с вовлечением только одного гена CNTN6. Такие животные, несомненно, являются более адекватной моделью CNV гена CNTN6 человека, чем нокаутные мыши.

Финансирование исследования: *Работа поддержана РФФ, грант № 14-15-00772.*

**Силачев Д.Н.<sup>1,2</sup>, Данилина Т.И.<sup>1</sup>, Бабенко В.А.<sup>1</sup>, Плотников Е.Ю.<sup>1</sup>, Зоров Д.Б.<sup>1</sup>, Сухих Г.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского,

МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский

центр акушерства, гинекологии и перинатологии

им. акад. В.И. Кулакова

silachev.dn@genebee.msu.ru

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает массивную гибель клеток головного мозга с последующими стойкими функциональными нарушениями. Большая часть повреждения мозга формируется в первые часы, и в клинической практике лекарственные препараты, способные предотвращать клеточную гибель в данном периоде, практически отсутствуют. Одним из перспективных способов коррекции неврологических нарушений является усиление регенерации и пластичности головного мозга трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), которые обладают нейропротекторными свойствами за счет секреции биологически активных веществ. Однако для успешного клинического использования необходимо решение ряда вопросов, таких как поиск оптимального источника ММСК, определение способа и схемы их трансплантации. Задачей данного исследования являлось изучение на модели ЧМТ у крыс нейропротекторной эффективности ММСК в зависимости от источника их получения, способа доставки в головной мозг и оценка влияния провоспалительного микроокружения. Для клинического использования предлагаются различные источники ММСК, но главным образом, костный мозг или жир. Имеющиеся исследования говорят о том, что данные типы клеток отличаются по составу секретируемых ими паракринных факторов в зависимости от возраста донора. Мы исследовали влияние данного фактора на нейропротекторные свойства ММСК. ЧМТ моделировали методом дозированного контузионного повреждения открытого мозга, оценивали объем повреждения (MPT) и сенсомоторный дефицит. ММСК выделяли из костного мозга 18-сут. эмбрионов, 7-сут. новорожденных и 18-мес. старых крыс. ММСК трансплантировали в/в (v. jugulares) в дозе  $3 \times 10^6$  клеток/кг через 24 ч. после ЧМТ. Было показано, что ММСК, полученные из костного мозга плодов и новорожденных крысят, оказывали выраженное нейропротекторное действие, вызывая снижение объема повреждения и регресс неврологической симптоматики, тогда как ММСК от старых крыс таким действием не обладали. Сравнение в/в и в/а (a. carotis interna) способов введения ММСК показало большую нейропротекторную эффективность в/а инъекции клеток по снижению объема повреждения и неврологического дефицита. Так же наблюдались различия по количеству ММСК в ткани мозга, оцененных методом MPT (ММСК, меченные микрочастицами железа) и сцинтиграфией (ММСК, меченные изотопом Tc-99). ЧМТ сопровождается развитием воспаления, которое может оказывать воздействие на ММСК и модулировать их терапевтическую эффективность. В этой связи оценивали влияние провоспалительного воздействия

(инкубация с ЛПС) на нейропротекторные свойства ММСК. Выявлено, что воздействие ЛПС увеличивает в ММСК продукцию цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF $\alpha$ , а также MMP-2 и MMP-9. Однако приобретение ММСК воспалительного фенотипа не приводило к снижению их терапевтической эффективности при ЧМТ. Таким образом, адресная доставка ММСК в головной мозг, а также использование клеток из перинатальных источников позволяет значительно повысить нейропротекторные эффекты клеточной терапии при ЧМТ.

**Багдасаров В.В., Багдасарова Е.А.,  
Симонян О.А., Люндуп А.В.,  
Крашенинников М.Е.**

*ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет)  
ovik\_87@mail.ru*

### **ИЗОЛИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАСПРОСТРАНЕННОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА**

Проблема эффективного лечения тяжелых форм распространённого перитонита (РП) остается вызовом в начале XXI века. Демонстрацией актуальности является высокая, не имеющая особой тенденции к снижению, летальность (32–43,9%). За последнее десятилетие в медицинской литературе появились работы, которые сообщают о новых возможностях клеточных технологий, а именно, о свойствах мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (МСК) (Shirley H. J. Mei, 2010).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Нами были проведены экспериментальные исследования по лечению тяжелого распространённого перитонита аллогенными МСК. Все манипуляции выполнялись с соблюдением требований к гуманному обращению с животными. Для моделирования тяжелого РП мы применили разработанный нами способ (Багдасарова Е.А., Багдасаров В.В., Симонян О.А. и др. Инфекции в хирургии, Т. 14, № 1, 2016 г. С. 10-14). Спустя 7–8 ч. после введения каловой взвеси в брюшную полость, экспериментальные животные были разделены случайным образом на 2 группы. 1-я группа – основная (15 шт.), животным выполнялась внутривенная (хвостовая вена) трансплантация аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в дозе  $1,5 \times 10^6$  на 100 г массы животного в 1 мл физиологического раствора хлорида натрия (Патент № 2553342 от 18.04.2014.). Во 2-й группе – контрольной (10 шт.), животным выполняли имитацию введения стволовых клеток, путем введения в хвостовую вену 1 мл физиологического раствора.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Летальность на 3-и сут. в основной группе составила 27%, а в контрольной 94%. При макроскопическом сравнении выяснилось, что воспалительный процесс в брюшной полости крыс, умерших на 3-и сут. эксперимента, был меньше у крыс из основной, чем у крыс из контрольной группы. При изучении окрашенных гистологических срезов оказалось, что у всех умерших животных наблюдался острый распространённый перитонит, но выраженность воспалительного процесса была разной в сравниваемых группах. В контрольной группе гистологическая картина характеризовалась отечной брюшиной

с диффузной нейтрофильной инфильтрацией; в почках наблюдалась ишемия клубочков, острый канальцевый некроз; в селезенке: картина септической селезенки. В основной же группе у погибших животных гистологическая картина характеризовалась разрешающимся перитонитом.

**ВЫВОДЫ.** Таким образом, результаты предложенного нового способа лечения распространённого перитонита в эксперименте, открывают новые возможности в решении этой тяжелой проблемы в хирургии.

**Синёв В.В.<sup>1</sup>, Сазонова М.А.<sup>1,2</sup>, Рыжкова А.И.<sup>2,3</sup>,  
Галицына Е.В.<sup>4</sup>, Постнов А.Ю.<sup>1</sup>, Орехов А.Н.<sup>2,5</sup>,  
Собенин И.А.<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России*

*<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт  
общей патологии и патофизиологии» РАН*

*<sup>3</sup> Московская государственная академия  
ветеринарной медицины и биотехнологии им.  
К.И. Скрябина*

*<sup>4</sup> Южный федеральный университет*

*<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт  
атеросклероза – Инновационный центр Сколково  
centaureaceanus@mail.ru*

### **СОЗДАНИЕ ЦИБРИДНЫХ ЛИНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ СУММАРНЫМ УРОВНЕМ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА**

**ЦЕЛЬ.** Цибридные культуры могут служить моделями для изучения дисфункции митохондриального генома и молекулярно-клеточных патологических процессов. Целью настоящего исследования было создание цитоплазматических гибридов (цибридов) с различающимся уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом.

**МЕТОДЫ.** При выполнении данной исследовательской работы была взята безмитохондриальная клеточная линия (pO), созданная на основе культуры моноцитарного происхождения ТНР-1. Цибридные клеточные линии получены с помощью ПЭГ-слияния. В качестве доноров митохондрий были использованы тромбоциты от людей с известным уровнем гетероплазмии мутаций мтДНК, определенным методом SNP-анализа на пиросеквенаторе PSQ96MA. Критерием отбора людей для данного исследования являлся пороговый уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом или с его отсутствием [1].

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Получены 3 цибридных линии, в которых суммарная нагрузка уровней гетероплазмии мутаций митохондриального генома, предположительно, обуславливает наличие атеросклероза (атерогенные); 2 цибридные линии, в которых суммарная нагрузка уровней гетероплазмии мутаций мтДНК, предположительно, обуславливает отсутствие атеросклероза (антиатерогенные); и 2 цибридные линии, в которых уровень гетероплазмии исследуемых мутаций ниже порогового уровня.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Созданные цибриды являются уникальным объектом исследования функционирования митохондрий и, в частности, определения степени влияния на данный процесс уровней гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом. Статья может

быть полезна специалистам по клеточной биологии и врачам, специализирующимся в области атеросклероза.

#### Литература:

1. Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Дефекты митохондриального генома и атеросклероз. Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки. Palmarium Academic Publishing GmbH, 2014, 354 с.

Финансирование исследования: *Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 14-14-01038).*

**Макеев О.Г.<sup>1</sup>, Сичкар Д.А.<sup>1</sup>, Мелехин В.В.<sup>2</sup>, Коротков А.В.<sup>1</sup>, Шуман Е.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России

<sup>2</sup> ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

larim@mail.ru

### **3D БИОЭКВИВАЛЕНТ ДЛЯ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ**

В настоящее время сохраняется актуальность проблемы терапии трофических и нейротрофических язв, ожогов, пролежней. Наиболее перспективным направлением считается применение тканеинженерных конструкций на основе жизнеспособных культивированных клеток человека. Однако, как показывает клинический опыт, эффективность применения таких конструкций остается невысокой. Анализ причин невысокой эффективности клеточной терапии повреждений кожи продемонстрировал её обусловленность следующими причинами: 1. В случае использования аллогенных клеток незначительный эффект обусловлен отторжением генетически чужеродных клеток. 2. При использовании аутологичных клеток последние, вследствие малой численности на плоскости биодеградируемого скаффолда, ускоренно утрачивают восстановительный потенциал вследствие их интенсивного деления и, тем самым, достижения клетками барьера Хейфика, что особенно выражено у пациентов старших возрастных групп. 3. Плоский скаффолд, обычно применяемый для создания биоэквивалентов кожи, не обеспечивает плотное прилегание клеток к раневой поверхности, имеющей сложную форму – впадины, карманы и пр. Вследствие этого часть клеток гибнет. 4. В условиях раны трансплантируемые клетки испытывают дефицит метаболитов, и прежде всего энергетических. С целью нивелирования указанных недостатков нами был разработан биоэквивалент кожи с использованием аутологичных клеток и носителя на основе биоразлагаемых микросфер, изготовленных из полилактида. Применение микросфер, имеющих на порядок большую поверхность, чем плоский носитель, позволяет внести в рану значимо больше клеток и, тем самым, заполнить раневую поверхность сколь угодно сложной формы. Кроме того, в процессе биоразложения полилактида образуется молочная кислота, которая является важным энергетическим субстратом. Клинические испытания разработанного способа проводили после согласования протокола с ЛЭК ФГБОУ ВО Уральского государственного медицинского университета Минздрава России. В ходе испытаний 10 пациентам, страдающим сахарным диабетом II типа, осложненным нейротрофическими язвами нижних конечностей, сохраняющимися, не-

смотря на терапию, от 4 мес. и более, площадью от 8,5 до 35,5 см<sup>2</sup>, по жизненным показаниям была выполнена трансплантация разработанного эквивалента. В ходе проведенных клинических исследований темпы заживления нейротрофических язв составили от 0,1 до 0,24 см<sup>2</sup>/сут. Эффективность составила 90%.

Финансирование исследования: *Бюджет.*

**Скалецкая Г.Н., Скалецкий Н.Н., Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Бубенцова Г.Н., Севастьянов В.И.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад.

В.И. Шумакова» Минздрава России

Skalink@mail.ru

### **ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСАМ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Интрапортальная аллотрансплантации островков поджелудочной железы (ПЖ) остается наиболее эффективным способом лечения тяжелых форм сахарного диабета 1 типа (СД1). Однако широкое применение указанного трансплантационного метода невозможно, прежде всего, из-за острого дефицита доноров, которыми оказываются чаще всего люди, погибшие от черепно-мозговой травмы. Поэтому актуальным является разработка новых подходов к клеточной терапии СД 1, одним из которых является разработка тканеинженерной конструкции (ТИК) ПЖ.

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния имплантации разработанной ТИК ПЖ на течение экспериментального сахарного диабета у лабораторных крыс.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В качестве тканевого компонента ТИК ПЖ использовали флотирующие островковоподобные культуры, полученные из ПЖ новорожденных кроликов, в качестве матрикса — биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ). Экспериментальный СД1 вызывали у крыс породы Вистар с помощью дробного введения стрептозотоцина. Шестнадцати животным со стойким диабетическим статусом ТИК ПЖ вводили в полость брюшины. Аналогичная группа диабетических крыс служила контролем. По окончании 8-недельного наблюдения ПЖ крыс-реципиентов и контрольных животных подвергали морфологическому, в том числе иммуногистохимическому, анализу.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** У 14 из 16 крыс с экспериментальным СД1 в течение 1–2 нед. произошло выраженное и достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение гликемии, сопровождавшееся купированием характерных признаков СД1. В контрольной группе ни у одного из животных не было отмечено реверсии диабетического статуса. При морфологическом исследовании ПЖ крыс-реципиентов было выявлено частичное восстановление пула собственных  $\beta$ -клеток, в то время как у контрольных крыс признаков регенерации  $\beta$ -клеток отмечено не было.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные позволили предположить наличие комбинированного антидиабетического эффекта при внутрибрюшинном введении ТИК ПЖ, обусловленного как непосредственным функционированием имплантата, так и его стимулирующим влиянием на регенерацию  $\beta$ -клеток в собственных островках крыс-реципиентов.

**Галибин О.В., Шевцов М.А., Скворцов А.Е.,  
Геньбач О.Г.**

*Первый Санкт-Петербургский государственный  
медицинский университет им И.П. Павлова  
skvortsov.spb@gmail.com*

### **БИОМЕХАНИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ КРЕПЛЕНИЯ ПРОТЕЗА НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Традиционная схема крепления протеза после ампутации конечности включает изготовление индивидуальной гильзы, достаточно плотно облегающей культю конечности, на которой монтируются остальные узлы протеза. Если вопрос взаимодействия костной ткани и титанового протеза практически решен, остается много вопросов в области пограничных взаимоотношений кожи и металла.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** При изучении возможности использования пористого титана с предварительной обработкой дермальными фибробластами для крепления протеза нижней конечности проведено исследование взаимоотношения пористого титана и культуры дермальных фибробластов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Результаты документированы морфологическими, гистологическими и электронномикроскопическими исследованиями. Разработано оптимальное покрытие для внутрикостных имплантатов на основе титаноорганических наноструктурированных матриц. Проведена имплантация обработанных дермальными фибробластами протезов в костномозговой канал бедренной кости кролика. При имплантации пористого титана происходит заполнение пор клетками и элементами межклеточного матрикса. Достигается остеоинтеграция: титановый стержень плотно фиксируется к окружающей костной и кожной ткани за счет проникновения в поры титана тканевых элементов.

**ВЫВОДЫ.** Полученные результаты позволяют повысить биоинтегративные свойства титановых имплантатов в реконструктивной хирургии нижней конечности.

Финансирование исследования: *Работа выполняется в рамках госзадания от ФГБОУ ВО «СПбГМУ им И.П. Павлова».*

**Скурихин Е.Г.<sup>1</sup>, Крупин В.А.<sup>1</sup>, Першина О.В.<sup>1</sup>,  
Пан Э.С.<sup>1</sup>, Пахомова А.В.<sup>1</sup>, Ермолаева Л.А.<sup>1</sup>,  
DariusW.<sup>2</sup>, Небольсин В.Е.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> НИИ фармакологии и регенеративной  
медицины им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ

<sup>2</sup> Школа фармации, Университет Рединга

<sup>3</sup> ООО «ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ»

eskurihin@inbox.ru

### **ИССЛЕДОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЮ ВСКРЫТИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГЕНЕРАЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (ХОБЛ)**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Терапия ХОБЛ основывается на использовании лекарственных средств и немедикаментозной терапии (оксигенотерапия, трансплантация легких и др.). Лечение улучшает качество жизни, функцию легких и физическую работоспособность, но полного выздоровления больного достичь невозможно. Новые эффективные пути терапии ХОБЛ связывают с постнатальными стволовыми клетками (СК) и прогениторными клетками.

**ЦЕЛЬ.** Изучить стволовые и прогениторные клетки мышей линии C57BL при моделировании симптомов ХОБЛ.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В эксперименте у мышей линии C57BL/6 экстрактом табачного дыма, панкреатической эластазой, D-галактозамин гидрохлоридом, хемокином MCP-1, ингибитором рецептора тирозинкиназы SU5416 моделировали симптомы ХОБЛ: воспаление, эмфизему, апоптоз эндотелиальных клеток, дефицит альфа1-антитрипсина. В работе проводились патоморфологические исследования легких (гистологические, иммуногистохимические методы), использовалась магнитная сепарация для выделения СК и прогениторных клеток, цитофлуориметрический анализ специфических маркеров СК и прогениторных клеток, методами культуры оценивались свойства клеток, иммуноферментным анализом изучали макромолекулы и низкомолекулярные соединения. Объектом исследования выступили СК и прогениторные клетки легких, крови, костного мозга. Проводилось исследование влияния нейротропных соединений (резерпин, кетансерин, спиперон (Sigma)), на воспаление, эмфизему легких, регенерацию альвеолярного эпителия и эндотелия, и внеклеточного матрикса, СК и прогениторные клетки при моделировании различных симптомов ХОБЛ.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показана неоднозначная реакция СК и прогениторных клеток у мышей линии C57BL/6 при моделировании симптомов ХОБЛ. В общей популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (ММСК), фибробластных прогениторных клеток, эпителиальных и эндотелиальных прогениторных клеток выявлены субпопуляции как с высокой, так и с низкой функциональной активностью. Получены представления о Notch1-сигналинге ММСК и фибробластных прогениторных клеток, предшественников гемангиогенеза и эндотелиальных прогениторных клеток, эпителиальных прогениторных клеток, стволовых клеток легких при моделировании воспаления и эмфиземы легких, дефицита альфа1-антитрипсина. Представлены новые мишени (СК и прогениторные клетки) для фармакологической стимуляции регенерации альвеолярной ткани при ХОБЛ. Предложен новый путь фармакологической регуляции СК и прогениторных клеток при ХОБЛ, основанный на использовании нейротропных соединений. В клинику легочных заболеваний для апробации предложены новые критерии диагностики, прогноза течения (возникновения осложнений) и эффективности лечения ХОБЛ.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках НИР НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, дополнительный источник финансирования ООО «ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ» (г. Москва)*

**Слободкина Е.А.<sup>1</sup>, Нимирицкий П.П.<sup>2</sup>,  
Долинкин А.О.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>2</sup>,  
Парфёнова Е.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины МНОЦ  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
kslobodkina@mail.ru

### **РАЗРАБОТКА ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ФАКТОР РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ (HGF) И ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGF165)**

Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является генная терапия для экспрессии ангиогенных факторов роста с целью лечения сердечно-сосудистых заболеваний – «терапевтический ангиогенез». Ранее в нашей лаборатории было показано, что введение смеси плазмид, кодирующих VEGF165 и HGF, приводит к восстановлению кровотока в ишемизированной конечности мыши, при этом эффективность ангиогенеза была выше, чем при введении каждой плазмиды по отдельности. Существенными недостатками введения смеси векторов является низкая вероятность ко-трансфекции клеток двумя плазмидами, различия экспрессии вводимых генов и снижение эффективности их совместного действия. Для ко-экспрессии двух и более генов разрабатываются мультицистронные конструкции, например, векторы, включающие внутренние сайты посадки рибосом (IRES). Плазмиды, несущие IRES, позволяют осуществлять одновременную экспрессию нескольких генов, однако, эффективность трансляции, обеспечиваемой IRES, обычно существенно уступает кэп-зависимой инициации, а конечное соотношение концентраций синтезируемых белков варьирует в зависимости от выбранного IRES. В настоящее время наиболее часто используется IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV). На основе вектора рVAX нами были созданы конструкции VEGF-IRES<sub>EMCV</sub>-HGF (VIN) и HGF-IRES<sub>EMCV</sub>-VEGF (HIV). Для оценки продукции VEGF165 и HGF клетки HEK293 трансфицировали кальций-фосфатным способом, концентрации VEGF165 и HGF в клеточной среде оценивались методом ИФА. При трансфекции клеток плазмидой VIN не наблюдалась продукция HGF, поэтому было решено отказаться от использования данного вектора. Соотношение молярных концентраций HGF/VEGF165 после трансфекции плазмидой HIV составило около 23:1. Дальнейшая работа заключалась в оптимизации вектора HIV, для чего нами были сконструированы несколько вариантов плазмид. На основе литературных данных для использования в новых векторах были выбраны IRES белков зукариот: Bir, FGF1 и eIF4G. Анализ эффективности плазмид проводился аналогично. Молярные концентрации HGF и VEGF165 различались в 42,5 и 26,5 раз при использовании плазмид с IRES белков Bir и FGF1 соответственно. При трансфекции клеток вектором с IRES<sub>eIF4G</sub> синтезировались плохо детектируемые количества обоих белков. Как и в случае с использованием вирусного IRES, наблюдалась низкая продукция VEGF165, поэтому плазмиды с IRES<sub>EMCV</sub>, а также с IRES белков Bir и FGF1 были модифицированы путем замены последовательно-

сти VEGF165 на VEGF<sub>Fort</sub> с оптимизированной последовательностью Козак. Результаты ИФА показали, что оптимальным для использования является вектор HGF-IRES<sub>EMCV</sub>-VEGF<sub>Fort</sub>: при трансфекции им синтезировались достаточно высокие концентрации целевых белков, при этом соотношение их молярных концентраций составляло около 5:1 в отличие от 15-40:1 при использовании конструкций с иными тестируемыми IRES. Дальнейшая работа будет заключаться в оценке биологической активности выбранного вектора и разработке на его основе препарата для генной терапии ишемических заболеваний. В настоящее время на рынке или в клинических исследованиях препаратов, основанных на бицистронных плазмидных векторах, не имеется, что делает дальнейшую разработку препарата актуальной.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках госзадания и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы Развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Сметанина М.А.<sup>1,2</sup>, Захарова И.С.<sup>1,3,4</sup>,  
Севостьянова К.С.<sup>1,2</sup>, Филиппенко М.Л.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.  
акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
maria.smetanina@gmail.com

### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ OXA1L И BCS1L, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ МЕТАБОЛИЗМ АТФ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ВЕН, КЛЕТКАМИ ВЕНОЗНОЙ СТЕНКИ**

ВВЕДЕНИЕ. Варикозная болезнь вен – классическое мультифакториальное заболевание, обусловленное взаимодействием внешних факторов и особенностей структуры и регуляции большого количества генов. В результате ранее проведенного нами объединенного микрочипового анализа транскриптома и метилома парных образцов вен (здоровой и варикозной), была выявлена дифференциальная экспрессия генов OXA1L и BCS1L, определяющих метаболизм АТФ, в варикозных венах (по сравнению со здоровыми). Белковый продукт гена OXA1L, расположенный на внутренней мембране митохондрий, участвует в сборке цитохром С-оксидазного и АТФазного комплексов митохондриальной дыхательной цепи. Белковые продукты гена BCS1L участвуют в сборке комплекса III митохондриальной дыхательной цепи. Они не являются продуктом митохондриального генома, однако импортируются в митохондрии. Мы полагаем, что внутренний, средний и наружный слои венозной стенки, представленные соответственно эндотелиальными, гладкомышечными клетками и фибробластами, вносят различный вклад в экспрессию генов OXA1L и BCS1L в вене. Кроме того, разный уровень экспрессии этих генов в варикозной и здоровой венах может быть обусловлен изменением уровня их экспрессии в определенном слое, что может также опосредовать патологический процесс.

ЦЕЛЬЮ данной работы было выявление относительной экспрессии этих генов в разных типах клеток, представляющих слои венозной стенки.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Клетки вены получали из послеоперационного материала с помощью культивирования в соответствующих средах и последующего сортирования. Содержание мРНК в образцах клеток вены определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, матрицей для которой служила кДНК, полученная с помощью реакции обратной транскрипции.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Было обнаружено, что уровень мРНК генов OXA1L и VCS1L в клетках эндотелия вены более чем на 2 порядка выше по сравнению с гладкомышечными клетками вены и фибробластами. Таким образом, основной вклад в экспрессию этих генов вносят эндотелиальные клетки внутреннего слоя венозной стенки.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Наши данные являются дополнительным свидетельством в пользу того, что процесс ремоделирования венозной стенки начинается в эндотелиальном слое, и факторы, приводящие к морфологическим изменениям стенки вены, активируют каскад молекулярных процессов от ее внутреннего слоя к внешнему. Это открывает новые вопросы для дальнейших исследований, в частности, выяснения возможной взаимосвязи количественных и структурных особенностей митохондриальной ДНК с экспрессией генов, определяющих метаболизм АТФ при варикозном расширении вен.

Финансирование исследования: РНФ 17-75-20223 (препарирование слоев вен, выделение РНК, ОТ-ПЦР в реальном времени) и РНФ 17-75-10047 (культивирование и выделение клеток).

#### **Смышляев И.А.**

ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации  
mutant89@rambler.ru

#### **ПРИМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СУСТАВНОГО ХРЯЩА КОЛЕННОГО СУСТАВА**

В последние годы отмечается неуклонный рост заболеваемости остеоартрозом коленного сустава. Доля данной патологии составляет более 83% от общей заболеваемости остеоартрозом, кроме того наблюдается увеличение числа молодых пациентов. Результаты лечения существующими методами не вполне удовлетворительные.

**ЦЕЛЬ.** Оценить безопасность и эффективность интраартикулярного введения аутологичной стромально-васкулярной фракции клеток жировой ткани для лечения остеоартроза коленного сустава.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** На момент написания статьи в исследование включено 28 пациентов. В рамках дневного стационара у каждого пациента забирали жировую ткань (шприцевая липосакция под местной анестезией), из которого в течение 1,5 ч. выделяли стромально-васкулярную фракцию клеток и немедленно вводили в полость сустава. Наблюдение за пациентами осуществляли в течение 6 мес. после введения клеточного продукта. Нами представлены данные по эффективности, полученные на 10 больных, которые завершили участие в исследовании в соответствии с протоколом, и данные по безопасности, полученные для всех 28 пациентов. Эффективность оценивали при помощи инструментальных методов обследования, а также валидированных вопросников.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Ни у одного больного не было выявлено нежелательных явлений или нежелательных реакций. При оценке эффективности выявлено статистически значимое снижение выраженности боли, оцененной по визуально-аналоговой шкале, через неделю после введения стромально-васкулярной фракции клеток жировой ткани. Выраженность боли продолжала снижаться на протяжении всего периода наблюдения. Оценка качества жизни пациентов по шкале KOOS, выявила улучшение качества жизни начиная с четвертой недели после интраартикулярной инъекции клеток. При клинической оценке функции коленного сустава с использованием части 1 вопросника KSS установлено достоверное повышение суммы баллов через 8 нед., а части 2 вопросника KSS – через 6 мес. после введения клеточного продукта. При оценке качества жизни с помощью вопросника SF-36 выявлено улучшение физического компонента здоровья, статистически значимое на 2 и 6 мес. исследования. Не выявлено статистически значимого улучшения психологического компонента здоровья, однако, наблюдается отчетливая тенденция к улучшению данного показателя.

**ВЫВОДЫ.** Предварительные результаты клинического исследования свидетельствуют о безопасности и эффективности интраартикулярного введения аутологичной стромально-васкулярной фракции клеток жировой ткани для лечения остеоартроза коленного сустава.

Финансирование исследования: ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» УДП РФ.

#### **Соколов М.Е., Маркосян В.А., Сафиуллов З.З.**

Казанский государственный медицинский университет  
supermihon@yandex.ru

#### **КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ИНСУЛЬТА ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Современные экспериментальные и клинические исследования по использованию мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека предполагают применение их в качестве носителей терапевтических генов. Удобство использования МККП в составе генно-клеточного препарата обусловлено их пригодностью как для аллогенной, так и аутологичной трансплантации человеку, низкой иммуногенностью, простотой получения и хранения. В настоящем исследовании МККП, экспрессирующие трансгены VEGF, GDNF и NCAM, были использованы для терапии ишемического инсульта головного мозга у крыс. Рекомбинантные вирусные вектора на базе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5), несущие гены зелёного флуоресцирующего белка (GFP), нейрональной молекулы адгезии (NCAM), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) использовали для трансдукции МККП. Были получены две генно-клеточные конструкции: (1) МККП+GFP и (2) МККП+VEGF-GDNF-NCAM. Через четыре часа после инфаркта головного мозга животные получали интратекальную инъекцию: (1) 0,9% NaCl (n = 5); (2) 2×10<sup>6</sup> МККП+GFP (n = 6); (3) 2×10<sup>6</sup> МККП+VEGF+GDNF+NCAM (n = 6). Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и использовали для иммунофлуоресцентного анализа. Программой ImageJ определяли объём и

площадь инфаркта мозга. Иммунофлуоресцентное исследование проводили с использованием антител к специфическим маркерам астроцитов (GFAP), олигодендроцитов (Olig2), клеток микроглии (Iba1), нейронов (PSD95 и Synaptophysin), а также к маркерам апоптоза (Caspase 3) и белкам теплового шока (Hsp70). Через три недели объем инфаркта коры мозга у контрольных животных был значительно больше, чем у животных в обеих терапевтических (МККП+GFP и МККП+VEGF-GDNF-NCAM) группах. Таким образом, МККП оказывают выраженный позитивный эффект на сохранность вещества коры головного мозга после ишемического инсульта. В то же время с помощью иммунофлуоресцентного исследования установлено, что терапевтические молекулы (VEGF, GDNF и NCAM), продуцируемые МККП, обеспечивают более эффективное морфофункциональное восстановление коры мозга в зоне инсульта. Пониженное количество астроцитов и клеток микроглии, предполагающие снижение астроглиоза, увеличенная пролиферация олигодендроцитов, способствующая миелинизации нервных отростков, повышение экспрессии синаптических белков и снижение иммуноэкспрессии Caspase 3 и Hsp70 демонстрируют более эффективное восстановление коры головного мозга у животных в группе МККП+VEGF-GDNF-NCAM. В данной работе, мы впервые демонстрируем терапевтический эффект генетически модифицированных МККП у крыс с моделью ишемического инсульта головного мозга. Наши результаты дают основание полагать, что интратекальная инъекция МККП, экспрессирующих трансгены молекул-стимуляторов нейрорегенерации (VEGF, GDNF и NCAM), представляет новый потенциально успешный подход к терапии ишемического инсульта.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-75-10053.*

**Соколова М.Г.<sup>1</sup>, Лопатина Е.В.<sup>2</sup>,  
Пенниайнен В.А.<sup>3</sup>, Кипенко А.В.<sup>3</sup>,  
Гавриченко А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН sokolova.m08@mail.ru

### **ОРГАННАЯ КУЛЬТУРА НЕРВНОЙ ТКАНИ – ТЕСТ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ПАТОГЕНЕЗА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**ЦЕЛЬ.** Провести сравнительный фармакологический анализ химических соединений, осуществляемый с помощью методов органотипической культуры ткани и конфокальной микроскопии, для проведения персонализированного лечения детей с редкими наследственными болезнями периферического двигательного нейрона.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Объектами тестирования была сыворотка крови больных редкими наследственными болезнями периферического двигательного нейрона (спинальная мышечная атрофия I типа и II типа (n = 18), наследственная мотосенсорная невропатия I и III типа (n = 7)) в возрасте 8–12 лет. Тестирование химических соединений (гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и фактор роста нерва

(ФРН)) осуществлялось в органотипической культуре ткани при использовании 300 сенсорных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов на один образец сыворотки крови больного. Культивировали исследуемые эксплантаты в чашках Петри на подложках из коллагена в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Сапуо», Япония), разделенных по 100 эксплантатов в чашках Петри под маркировкой А, В и С. Чашки А содержали эксплантаты с добавлением сыворотки крови больных в разведении 1:70, в чашки В, содержащих сыворотку крови больного, добавляли ГАМК (10-5), в чашки С добавляли ФРН (100 нг/мл). Контрольные эксплантаты (n = 300) культивировали в питательной среде стандартного состава в чашках под маркировкой К. Для количественной оценки роста эксплантатов спинальных ганглиев применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной площади. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Оценку ИП проводили через 3 сут. Культивирование происходило при 36,5°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для визуализации объектов использовали микроскоп AxiostarPlus (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ ИП исследуемых эксплантатов показал, что в образцах А и С отсутствовал рост нейритов сенсорных ганглиев в сравнении с контрольными образцами. В образцах с маркировкой В индекс площади экспериментальных эксплантатов практически не отличался от контрольного значения. Проведенное ранее исследование сыворотки крови данных больных выявило высокое содержание нейротрофина ФРН. Была отмечена нелинейная отрицательная корреляционная связь между признаками (p < 0,001) (SpearmanR = -0,90) – концентрацией ФРН и нейритингибирующим эффектом сыворотки крови в культуре ткани. Этим фактом можно объяснить отсутствие стимулирующего эффекта на рост нейритов при добавлении в среду ФРН. Стимулирующее влияние, выявленное в образцах В, связано, по нашему мнению, со способностью ГАМК взаимодействовать с рецепторами, как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровне, т.е. осуществлять торможение и стабилизировать внутринейронные взаимодействия в сенсорном ганглии.

**ВЫВОДЫ.** Была проведена апробация тест-системы с использованием органотипической культуры ткани для подбора патогенетического лечения больным детям с наследственной патологией периферического двигательного нейрона, которая показала нейритстимулирующий эффект гамма-аминомасляной кислоты. Все вышеизложенное позволяет говорить об актуальности применения тест-системы с использованием органотипической культуры ткани для подбора эффективных доз лекарственных средств на этапе именно *in vitro* исследований, проводя их адресно, индивидуализируя работу по каждому пациенту.

**Гавриченко А.В.<sup>1</sup>, Лопатина Е.В.<sup>2</sup>,  
Соколова М.Г.<sup>1</sup>, Пенниайнен В.А.<sup>3</sup>,  
Кипенко А.В.<sup>3</sup>, Пасатецкая Н.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный  
медицинский университет им. И. И. Мечникова»  
Минздрава России

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский  
центр им. В. А. Алмазова Минздрава России

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН  
sokolova.m08@mail.ru

### **ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОТРОФОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ В ПРИСУТСТВИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ 2 ТИПА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Ране проведенная серия опытов с сывороткой крови больных спинальной мышечной атрофией (СМА) 2 типа в органотипической культуре ткани выявила ингибирующий эффект сыворотки крови на рост нейритов сенсорных ганглиев. Дальнейшее исследование данного феномена проводилось в направлении поиска биологически активных субстанций, которые могли бы нивелировать нейритингибирующий эффект.

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния коменовой кислоты на процесс ингибирования роста нейритов, в эксперименте с органотипической культурой ткани в присутствии сыворотки крови больных СМА 2 типа.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Объектами исследования были 1800 сенсорных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение 3-х сут. при 36,5°C и 5% CO<sub>2</sub>. Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава. В 900 экспериментальных чашках в культуральную среду добавляли сыворотку крови больных СМА 2 типа (n = 12). В остальные чашки вместе с сывороткой крови больных СМА 2 типа в культуральную среду добавляли коменовую кислоту (5-окси-у-пирон-2-карбоновая кислота) (10–8М). Для визуализации объектов использовали микроскоп AxiostarPlus (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для количественной оценки роста эксплантатов спинальных ганглиев применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной площади. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Сыворотка крови 12 больных СМА 2 типа была исследована в широком диапазоне разведений (1:100–1:2). В разведениях 1:2, 1:10, 1:50, 1:70 сыворотка больных полностью блокировала рост нейритов сенсорных ганглиев. Индекс площади исследуемых эксплантатов был ниже контрольных значений в среднем на 25%. При дальнейшем разведении сыворотки крови на рост нейритов не влияла. Культивирование сенсорных ганглиев в среде, содержащей плазму пациентов со СМА 2 типа (1:70) и коменовую кислоту (5-окси-у-пирон-2-карбоновая кислота) (10–8М), устраняло нейритингибирующий эффект плазмы. Индекс площади экспериментальных эксплантатов

практически не отличался от контрольного значения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что коменовая кислота оказывает нейротрофотропное влияние на сенсорные ганглии, усиливая рост нейритов в присутствии сыворотки крови больных СМА 2 типа, который основан на модуляции сигнальной функции Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы через Nav1.8-канал, функционирующий в физиологических условиях в процессах тканевого моделирования.

**ВЫВОДЫ.** Серия экспериментов в органотипической культуре ткани в присутствии сыворотки крови больных СМА 2 типа выявила нейротрофотропное действие коменовой кислоты. Дальнейшее изучение данного феномена может способствовать разработке лекарственных препаратов на основе коменовой кислоты для стимуляции регенеративной функции нервной ткани у больных СМА.

**Солопов М.В.<sup>1</sup>, Турчин В.В.<sup>2</sup>,  
Попандопуло А.Г.<sup>2</sup>, Лёгенький Ю.А.<sup>1</sup>,  
Беспалова С.В.<sup>1</sup>, Фисталь Э.Я.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Донецкий национальный университет

<sup>2</sup> Институт неотложной и восстановительной  
хирургии им. В.К. Гусака  
mxsolopov@yandex.ru

### **ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, МАРКИРОВАННЫХ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ПРИ МАЛОМ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В течение последних лет стали популярными исследования по созданию магнитоуправляемых клеток человека (в том числе стволовых) путём маркирования магнитными наночастицами. Основной целью таких исследований является выработка технологии эффективного таргетинга клеток при трансплантации *in vivo*. В связи с этим является актуальным поиск оптимальных методик модификации клеток с максимально возможным сохранением жизнеспособности, пролиферативного потенциала и других функций.

**ЦЕЛЬ.** Целью исследования являлась оценка жизнеспособности и метаболической активности магнитомаркированных фетальных фибробластов человека (ФФЧ), полученных при инкубации с магнитными наночастицами при малом времени экспозиции.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для магнитной модификации клеток использовались наночастицы магнетита, стабилизированные цитратом натрия. Магнитомаркированию подвергалась культура ФФЧ 4-го пассажа при достижении ~90% субконфлюэнтного монослоя. Для маркировки клеток использовали растворы на основе среды RPMI без сыворотки с содержанием Fe от 0.5 до 15 мМ и 10 мМ лимонной кислоты. pH маркирующего раствора корректировали до значения 7.4 путём внесения раствора 1М NaOH. Перед модификацией клетки отмывали фосфатным буферным раствором с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. После отмывки в культуральные сосуды вносили маркирующие растворы и проводили инкубацию клеток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности на протяжении 20 мин. По завершении маркирования клетки отмывали средой RPMI с 5 мМ содержанием лимонной кислоты (RPMI-Cit). Для достижения интернализации частиц клетки дополнительно инкубировали на протяжении 2 ч. в среде RPMI-Cit при указанных выше условиях. Уровень жизнеспособ-



ности модифицированных клеток оценивали непосредственно после процедуры магнитомаркирования путём прижизненного окрашивания трипановым синим. Оценку метаболической активности клеток осуществляли с использованием МТТ-теста. Также проводили спектрофотометрическое определение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в магнитомаркированных клетках, используя тест с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Жизнеспособность клеток после магнитомаркирования при окрашивании трипановым синим сохранялась на высоком уровне (>95%) даже при максимальной концентрации Fe. Результаты по определению метаболической активности также свидетельствуют о достоверно незначительном изменении показателя МТТ-теста у магнитомаркированных клеток по сравнению с контрольными ( $p < 0.05$ ). Однако результаты ТБК-теста указывают на существенный рост содержания продуктов ПОЛ (от 180 до 360%) при повышении концентрации Fe, используемой при модификации клеток.

**ВЫВОДЫ.** Результаты исследования свидетельствуют о том, что, в соответствии с описанной методикой магнитомаркирования, можно получать жизнеспособные клетки с нормальным уровнем метаболической активности. Тем не менее, повышение уровня продуктов ПОЛ сигнализирует об образовании внутри клеток свободных радикалов и возможном дальнейшем нарушении клеточного гомеостаза.

**Сотниченко А.С.<sup>1</sup>, Губарева Е.А.<sup>1</sup>, Куевда Е.В.<sup>1</sup>,  
Гуменюк И.С.<sup>1</sup>, Накохов Р.З.<sup>1</sup>, Орлов С.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»  
alex24.88@mail.ru

#### **ПРОБЛЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ МАТРИКСОВ ТРУБЧАТЫХ И ПОЛЫХ ОРГАНОВ НА ПРИМЕРЕ СЕРДЦА И ПИЩЕВОДА НЕЧЕЛОВЕКООБРАЗНЫХ ПРИМАТОВ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В настоящее время проведено большое количество работ по децеллюляризации таких органов как пищевод и сердце. Большинство из них проведено на примере мелких лабораторных животных. Однако непосредственная трансляция полученных результатов на модели более крупных животных, таких как нечеловекообразные приматы, невозможна без существенных дополнений и изменений.

**ЦЕЛЬ.** Адаптация существующих протоколов децеллюляризации сердца и пищевода для применения на модели нечеловекообразных приматов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Для создания ацеллюлярных матриксов сердца и пищевода использовали органы 3 самцов макак-резус (*Macaca mulatta*), полученные во время аутопсии животных, умерших от естественных причин. Средний возраст животных составил  $8,3 \pm 3,2$  года, вес  $15,2 \pm 3,1$  кг. Применяли детергент-энзиматические протоколы децеллюляризации с использованием 4% раствора дезоксихолата натрия и свиной панкреатической ДНК-азы. Результаты оценивали посредством гистологического окрашивания получаемых образцов гематоксилином и эозином, флуорохромирования DAPI, иммуногистохимического анализа с определением основных белков внеклеточного матрикса, количественного ана-

лиза содержания ДНК, механического тестирования образцов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Очевидной особенностью децеллюляризации сердца нечеловекообразного примата в сравнении с крысиным явилась разница в размерах органов, в связи с чем потребовалась значительная модификация процедуры. Во-первых, иные, чем в сердце крысы, диаметр сосудов и масса миокарда потребовали в несколько раз увеличить время перфузии сердца детергентами и энзимами с 24 до 120 ч. Во-вторых, поддержание постоянного давления жидкости в аорте на уровне 120 мм. рт. ст. позволило улучшить доставку рабочего раствора во все камеры сердца и избежать неполной децеллюляризации в отдаленных от устья коронарных сосудов участках сердца, таких как верхушка и перегородка. Также потребовалось ввести большее количество повторяющихся циклов обработки детергентом. В то же время, действующие вещества и концентрация рабочих растворов в оригинальном протоколе позволяли максимально сохранять структуру внеклеточного матрикса, поэтому указанные параметры изменены не были. Главной трудностью при децеллюляризации пищевода нечеловекообразного примата, помимо более высокой массы органа, стала его длина. Использование методики, апробированной на крысах, приводило к неравномерным изменениям по всей длине органа. Чрезмерное разрушение волокон матрикса и его полная децеллюляризация с одной стороны сочеталась с отсутствием каких либо изменений с другой стороны. Авторы связывают данное явление с высокой растяжимостью органа и, как следствие, значительными колебаниями давления перфузирующих растворов на протяжении органа. Способом решения указанной проблемы стало снижение исходной скорости перфузии со 150 до 100 мл/мин при неоднократном изменении ее направления. Таким образом, трансляция протоколов децеллюляризации органов мелких животных для работы с органами нечеловекообразных приматов невозможна без учета специфики и анатомо-физиологических особенностей этих организмов.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоракальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».*

**Старкова Т.Ю., Томилин А.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии» РАН  
t.starkova@incras.ru

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ HMGB1 И HMGB2 В ХРОМАТИНЕ ЭСК МЫШИ**

Пролиферация, дифференцировка ЭСК, а также скорость роста злокачественных образований и распространения метастаз в животных моделях, согласно литературным данным, напрямую зависит от уровня экспрессии и, возможно, модификационного статуса, взаимодействующих с маркером плюрипотентности Oct4 негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2 семейства HMG (от англ. HighMobilityGroup). Большой объем экспериментальных данных, посвященных исследованию роли негистоновых белков HMGB-семейства в структурно-функциональной организации хроматина, свиде-

тельствует в пользу того, что высоко гомологичные HMGB1/HMGB2 принимают участие как в процессе активации генов, так и в процессе репрессии. Показано также, что HMGB1 может выступать в роли прототипической молекулы DAMP (Damage Associated Molecular Pattern Molecule), связанной как с острыми воспалительными реакциями, так и с большей частью молекулярных механизмов хронического воспаления и заживления. Учитывая вышесказанное, для эффективного внедрения эмбриональных стволовых клеток в медицинскую практику является важным дополнить и систематизировать сведения о механизмах функционирования HMGB1/HMGB2 в хроматине ЭСК, о роли данных белков в процессах клеточной дифференцировки и репрограммирования. Целью данной работы является исследование структурных характеристик (пост-трансляционных модификаций) и роли негистоновых хромосомных белков HMGB1/2 в изменениях структурно-функциональных параметров хроматина клеток в процессах дифференцировки и клеточного репрограммирования. С помощью FT(ICR)MS нами показано различие распределения и характера модификаций в высоко гомологичных белках HMGB1 и HMGB2, как в разных типах дифференцированных клеток (NIH/3T3, МЭФ, тимус мыши), так и в эмбриональных стволовых клетках мыши (E14), что подтверждает данные о различной функциональности этих белков в клетке. Выявлены функционально значимые различия в модификационном статусе HMGB1 дифференцированных и эмбриональных стволовых клеток мыши, в частности ask2-HMGB1 в хроматине ЭСК, что, согласно литературным данным, приводит к потере способности изгибать ДНК при связывании и, вероятно, должно повлечь за собой изменение функциональной нагрузки HMGB1 в хроматине ЭСК. Показано, что CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут генов HMGB1 и HMGB2 не приводит к изменению фенотипа ЭСК мыши. Проведено исследование уровня экспрессии факторов плюрипотентности Oct4, c\_Myc, Sox2 и Nanog в условиях дефицита HMGB1. В работе также будет обсуждаться влияние снижения уровня экспрессии HMGB1 и HMGB2 на процесс клеточной дифференцировки ЭСК. Мы надеемся, что полученные в ходе выполнения работы сведения помогут лучше понять и, следовательно, контролировать процессы дифференцировки и репрограммирования, тем самым, ускорят внедрение многообещающей технологии иПСК в практическую медицину.

Финансирование исследования: *Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ФГБУН ИИЦ РАН при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ 14-50-00068). Масс-спектры белков HMGB1/2 получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОВ ВО «СПбПУ».*

**Старостина И.Г.<sup>1</sup>, Соловьева В.В.<sup>1</sup>, Шаймарданова А.А.<sup>1</sup>, Аглиуллина Д.Р.<sup>1</sup>, Исаев А.А.<sup>2</sup>, Деев Р.В.<sup>3</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> Институт стволовых клеток человека

<sup>3</sup> Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
fairin@mail.ru

### **АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ДИСФЕРЛИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК НЕК293А ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ**

Возникновением мутаций в гене дисферлина (DYSF) человека обусловлено развитие дисферлинопатий, группы нейромышечных заболеваний, включающей миопатию Миоши, конечностно-поясную мышечную дистрофию типа 2Б, дистальную миопатию переднего ложа голени и проксимально-дистальные формы. Известно, что дисферлин участвует в образовании системы Т-трубочек, что придает клеточной мембране трубчатую форму. Описано накопление данного белка в местах повреждения сарколеммы мышечных клеток. В связи с этим предполагается участие данного белка в процессах репарации сарколеммы. Синтез нефункционального белка или его недостаточность вследствие мутаций в гене *DYSF* приводит к нарушению процессов восстановления сарколеммы и везикулярного транспорта, что опосредует дегенеративные и воспалительные процессы в мышечной ткани. Однако остаются неясными основные молекулярные и клеточные механизмы участия дисферлина в процессах репарации клеточных мембран. В настоящей работе проанализировано влияние эктопической экспрессии дисферлина на пролиферативную активность эмбриональных клеток почки человека НЕК293А после повреждения клеточной мембраны методом электропорации. Для достижения эктопической экспрессии дисферлина клетки НЕК293А трансфицировали ранее полученным плазмидным вектором pCMV-DYSF, кодирующим кДНК гена дисферлина человека. Трансфекцию проводили с использованием реагента TurboFect (ThermoFisherScientific, США) по методике, рекомендуемой производителем. Для оценки эффективности трансфекции и сравнительного анализа клетки НЕК293А трансфицировали плазмидным вектором pEGFP-N2 (Clontech, США), экспрессирующим улучшенный зеленый флуоресцентный белок EGFP. Электропорацию клеток проводили через 48 ч. после трансфекции на приборе GenePulserXcell™ ElectroporationSystems (Bio-Rad, США) при напряжении 200 В и времени импульса 25 мс в 0,4 см кювете. Активность митохондриальных дегидрогеназ, характеризующую пролиферативную активность клеток, оценивали с использованием набора CellTiter96 AQueousNon-RadiativeCellProliferationAssay (Promega, США) через 48 ч. после электропорации. Показано, что после электропорации пролиферативная активность клеток НЕК293А, трансфицированных плазмидой pCMV-DYSF (НЕК293А-DYSF), снизилась на 20% по сравнению с клетками НЕК293А-DYSF без электропорации. Интересно, что электропорация снижала пролиферативную активность клеток НЕК293А, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2 (НЕК293А-EGFP), на 40% в сравнении с клетками

HEK293A-EGFP без электропорации. Таким образом, после электропорации пролиферативная активность клеток HEK293A-DYSF была на 20% выше клеток HEK293A-EGFP. Данные результаты могут указывать о положительном влиянии экспрессии дисферлина дикого типа на процессы репарации мембран в клетках человека. Однако для подтверждения данной теории необходимы дальнейшие исследования с использованием других типов клеток и повреждающих мембраны воздействий.

Финансирование исследования: *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00657 и программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

**Стафеев Ю.С.<sup>1</sup>, Мичурина С.С.<sup>2</sup>,  
Воротников А.В.<sup>1</sup>, Меньшиков М.Ю.<sup>1</sup>,  
Парфёнова Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова  
yuristafeev@gmail.com

#### **ИЛ-4 ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВАЦИЮ ИНСУЛИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В АДИПОЦИТАХ ЗТЗ-L1 БЕЗ ВЛИЯНИЯ НА АДИПОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ**

В современном мире ожирение и сахарный диабет 2 типа, а также сопутствующие им патологии, являются одними из основных причин смертности и инвалидизации населения. Известно, что ожирение и диабет 2 типа сопряжены с развитием латентного воспаления жировой ткани. К настоящему времени накоплен определенный опыт как экспериментального, так и клинического применения противовоспалительных препаратов, блокирующих воспалительную клеточную сигнализацию, в терапии СД2Т. Однако, вопрос использования препаратов на основе агонистов противовоспалительной клеточной сигнализации до сих пор остается неизученным. В нашей работе мы проводили изучение возможностей использования агониста противовоспалительной клеточной сигнализации интерлейкина-4 для коррекции инсулиновой резистентности адипоцитов. Исследование проводили на дифференцированных адипоцитах линии ЗТЗ-L1. Преадипоциты ЗТЗ-L1 дифференцировали с использованием дифференцировочного коктейля (изобутилметилксантин, дексаметазон, розиглитазон, инсулин) с дальнейшим контролем дифференцировки по окрашиванию липофильным красителем OilRedO и уровню мРНК генов-маркеров адипоцитарной дифференцировки GLUT4 и PPAR $\gamma$  методом ПЦР в реальном времени. Для оценки динамики адипогенной дифференцировки в присутствии ИЛ-4 проводили аналогичный контроль дифференцировки на 0, 4, 6 и 10 дни адипоцитарной дифференцировки. Далее вызывали инсулиновую резистентность с помощью инкубации зрелых адипоцитов в присутствии конъюгата БСА и пальмитиновой кислоты с последующей оценкой уровня поглощения клетками радиоактивных аналогов 2-дезоксиглюкозы, а также оценкой фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации методом иммуноблоттинга. Для оценки влияния ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность клеток выполняли моделирование инсулиновой ре-

зистентности в присутствии ИЛ-4 в концентрациях 25 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл и оценивали инсулиновую чувствительность адипоцитов аналогичными методами. В ходе исследования были получены данные, свидетельствующие о позитивном влиянии ИЛ-4 на активность инсулиновой сигнализации в жировой ткани. В концентрации 50 нг/мл ИЛ-4 наиболее активно восстанавливал активационные фосфорилирования субстрата инсулинового рецептора 1 типа, протеинкиназы B, а также субстрата протеинкиназы B AS160. Концентрации ИЛ-4 25 нг/мл и 100 нг/мл оказывали позитивное воздействие на инсулиновую сигнализацию адипоцитов, однако эффективность концентрации ИЛ-4 в 50 нг/мл для восстановления инсулиновой сигнализации значительно выше. Также было показано, что ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл не оказывает значимого действия на способность преадипоцитов ЗТЗ-L1 к адипоцитарной дифференцировке по результатам окрашивания липофильным красителем OilRedO и данным ПЦР в реальном времени для генов-маркеров GLUT4 и PPAR $\gamma$ . Анализируя полученные результаты исследования, стоит отметить, что ИЛ-4 может использоваться для восстановления инсулиновой чувствительности адипоцитов в клеточной модели инсулиновой резистентности. Данное исследование имеет хорошую перспективу для дальнейшей трансляции в область экспериментальной диабетологии, с проверкой данного подхода на животной модели СД2Т, и, впоследствии, в клиническую практику.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80026 «мол\_эв\_а»*

**Степанова А.В.<sup>1</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>,  
Карагяур М.Н.<sup>2</sup>, Балацкий А.В.<sup>2</sup>,  
Кочегура Т.Н.<sup>2</sup>, Казарновский М.С.<sup>1</sup>,  
Шестакова М.В.<sup>3</sup>, Дедов И.И.<sup>3</sup>, Ткачук В.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России  
a-stepforward@yandex.ru

#### **СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ PPAR $\alpha$ , AMRKA1 И AMRKA2 НА АДИПОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ**

Сахарный диабет второго типа (СД2) является социально-значимым заболеванием, которое характеризуется сочетанием инсулинорезистентности (ИР) и снижением продукции инсулина клетками поджелудочной железы. Одной из основных причин развития ИР и СД2 является ожирение. Избыточное развитие жировой ткани определяется не только притоком питательных веществ, но и темпом адипогенеза (дифференцировкой фибробластоподобных клеток под действием инсулина и глюкокортикоидных гормонов

в адипоциты). На настоящий момент результаты многих научных работ позволяют предположить, что ИР, развитие ожирения, а также индивидуальные особенности ответа на терапию противодиабетическими препаратами, обусловлены нарушением экспрессии или мутациями факторов транскрипции и ферментами, участвующими в метаболизме. Однако имеющиеся литературные данные показывают лишь ассоциацию генотипа с клиническими проявлениями, тогда как механизмы влияния генетического полиморфизма на течение заболевания и чувствительность к препаратам остаются неизвестными. Ранее было показано, что одним из ключевых регуляторов адипогенной дифференцировки является транскрипционный фактор PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  также служит молекулярной мишенью для известных антидиабетических препаратов группы тиазолидиндионов. Эти препараты, связываясь с транскрипционным фактором PPAR $\gamma$ , увеличивают чувствительность адипоцитов к инсулину и снижают уровень глюкозы в крови. Однако в ходе их применения накопилось множество данных о различиях в индивидуальной чувствительности к ним. Так, у некоторых пациентов при попытке коррекции состояния ИР наблюдалось выраженное увеличение массы тела. Данные об индивидуальной чувствительности пациентов к терапии были получены и для основного противодиабетического препарата метформина, среди молекулярных мишеней которого субъединицы аденозинмонофосфат-активируемой киназы (АМРК). Целью этой работы является выяснение роли известных полиморфизмов в генах PPARG (rs1801282, Pro12Ala), PRKAA1 (rs249429) и PRKAG2 (rs5017427) у пациентов с СД2 в превращении мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека в адипоциты и изменении чувствительности к метформину и розиглитазону. С помощью лентивирусной конструкции, кодирующей необходимые компоненты системы CRISPR/Cas9, нами на основе линии immortalized МСК человека были получены популяции клеток с подавленной экспрессией генов PPARG, PRKAA1 и PRKAG2. Было изучено влияние этих модификаций геномов на индукцию адипогенной дифференцировки и чувствительность к антидиабетическим препаратам. Нами ведётся подборка пациентов с СД2, имеющих данные полиморфизмы, с целью дальнейшего редактирования генома и установления молекулярных механизмов развития резистентности к инсулину и противодиабетическим препаратам.

**Финансирование исследования:** *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00026) «Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: выяснение молекулярных механизмов, ключевых сигнальных путей и транскрипционных факторов с целью определения биомаркеров для новых лекарственных средств».*

**Столбовая А.Ю., Смирнов И.В., Крутецкая И.Ю., Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б.**

*ФГБУ «РНЦ радиологии и хирургических технологий»*

anastasia.stolbovaya@gmail.com

### **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЭНДОГЛИНА ЗАМЕДЛЯЮТ МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ IN VITRO**

Эндоглин (CD105) представляет трансмембранный гликопротеин, который входит в состав рецепторных комплексов, распознающих ростовые факторы TGF- $\beta$ 1 и - $\beta$ 3. Эндоглин участвует в регуляции адгезии, миграции и пролиферации эндотелиальных клеток. Металлопротеиназа MMP14 способна отщеплять экстраклеточный фрагмент эндоглина с образованием растворимой формы белка, который обладает антиангиогенными свойствами. В лаборатории гибридомной технологии РНЦРХТ создана панель моноклональных антител, распознающих разные эпитопы эндоглина (Смирнов и др., 2015). Задачей работы было изучение эффекта моноклональных антител на миграцию клеток эндотелия EA.hy926 в тесте закрытия «раны» клеточного монослоя. Целостность монослоя клеток нарушали с помощью наконечника пипетки, после чего клетки культивировали в присутствии моноклональных антител (5 мкг/мл) в течение 24 ч. В контроле использовали моноклональные антитела того же изотипа, не распознающие эндоглин. Также исследовали эффект антител на клетки в присутствии рекомбинантного TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). Клетки фотографировали с помощью инвертированного микроскопа (AxioZeiss) непосредственно после нанесения «раны» и через 24 ч. Площадь «раны» определяли с использованием программного обеспечения, основанного на пакете EImage (<https://www.bioconductor.org/>). Нанесение «раны» приводило к увеличению образования растворимого эндоглина клетками эндотелия. Присутствие моноклональных антител к эндоглину замедляло процесс закрытия «раны» по сравнению с контролем. Ростовый фактор TGF $\beta$ 1 ускорял процесс уменьшения площади «раны». Присутствие антител к эндоглину нивелировало стимулирующий эффект TGF $\beta$ 1. Ингибирующее действие на миграцию клеток эндотелия было показано для четырех моноклональных антител, распознающих разные эпитопы эндоглина. Таким образом, связывание моноклональных антител с эндоглином вызывает замедление миграции интактных и стимулированных TGF $\beta$ 1 эндотелиальных клеток EA.hy926.

**Литература:**

1. И.В. Смирнов, И.В. Грязева, М.П. Самойлович, Л.А. Терехина, А.А. Пиневич, А.А. Крылова, И.Ю. Крутецкая, Н.Н. Никольский, В.Б. Климович. Панель моноклональных антител против эндоглина человека: получение и характеристика. Цитология, 2015, 57(7):499-508.

**Финансирование исследования:** *грант Российского научного фонда, номер проекта № 17-15-01230.*

**Строкова С.О.<sup>1</sup>, Арутюнян И.В.<sup>1</sup>,  
Муллабаева С.М.<sup>1</sup>, Фатхудинов Т.Х.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»  
Минздрава России

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы  
народов»  
estel.7@list.ru

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ТКАНИ ПУПОВИНЫ  
ЧЕЛОВЕКА: РАЗРАБОТКА БЕЗОПАСНОГО  
И ЭФФЕКТИВНОГО ПРОТОКОЛА**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Пупочный канатик является источником уникальных по своим свойствам мультипотентных стромальных клеток (МСК), однако доступ к нему открыт лишь однажды, сразу после рождения ребенка. Крупнейшие биобанки мира активно предлагают услуги криоконсервации ткани пуповины с целью выделения из неё аутогенных клеточных культур при возникновении необходимости в будущем. Безопасность клеточных трансплантатов во многом зависит от используемых протоколов криоконсервации и экспансии культур, при этом в большинстве протоколов используются ксеногенная сыворотка крови и потенциально токсичный диметилсульфоксид (ДМСО).

**ЦЕЛЬ.** Разработка эффективного протокола криоконсервации ткани пуповины, отвечающего xeno-free и DMSO-free стандартам.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Пуповину человека ( $n = 10$ ) получали при проведении родоразрешения путём операции кесарева сечения. Материал отмывали от крови, нарезали на диски толщиной 5 мм и помещали в криопротекторную среду. Использовали два типа криопротекторной среды: (1) эмбриональная телячья сыворотка с добавлением сахарозы до 0,5М и ДМСО до 10%, (2) фосфатно-солевой буфер pH 7,4 с добавлением сахарозы до 0,5М, глицерина до 20% и альбумина человека до 35 г/л. Материал охлаждали до  $-70^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . и переносили в криохранилище. Сравнение эффективности протоколов проводили через 1–2 нед. хранения. Сохранность жизнеспособности клеток оценивали с помощью МТТ-теста на макропрепаратах и окрашивания кальцеином-АМ и йодидом пропидия на поперечных криосрезах. Выделение первичных клеточных культур проводили методом эксплантов с предварительной ферментативной обработкой ткани. Принадлежность выделенных культур к МСК оценивали с помощью анализа иммунофенотипа и индукции направленной дифференцировки *in vitro*.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Оба используемых протокола обеспечивали сохранность архитектоники ткани пуповины после размораживания и выживаемость всех типов клеток: однослойного амниотического эпителия, стромальных клеток субамниотической, интерваскулярной и периваскулярной области, клеток стенок кровеносных сосудов и эндотелия. Эффективность выделения первичных клеточных культур из вартонова студня составила 100%. Клетки имели соответствующий МСК профиль экспрессии поверхностных антигенов CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD11b-, CD19-, HLA-DR- и отвечали на действие индукторов дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Разработанный протокол криоконсервации ткани пуповины человека без использования ксеногенных компонентов и ДМСО обеспечивает сохранность жизнеспособных клеток в ткани и возможность получения культур мультипотентных

стромальных клеток. Использование протоколов, соответствующих xeno-free и DMSO-free стандартам, необходимо для обеспечения качества полученных из криоконсервированной ткани клеточных культур, предназначенных для трансплантации.

Финансирование исследования: *Инициативная тема НИР РУДН № 030901-0-000.*

**Стуканёва М.Е.<sup>1</sup>, Соколов А.В.<sup>2</sup>, Пущина Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Национальный научный центр морской биологии

<sup>2</sup> Институт водных и экологических проблем  
ДВО РАН

Stykanyova@mail.ru

**НЕЙРОНАЛЬНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ В МОЗЖЕКЕ  
МОЛОДИ СИМЫ ONCORHYNCHUSMASOU ПРИ  
МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ**

У костистых рыб значительная часть вновь образованных нейронов выживает в течение длительного времени, поскольку, в отличие от млекопитающих, в мозгу рыб сенсорные проекции могут расти и развиваться всю жизнь из-за адаптации к постоянному увеличению размеров тела и объема входящей сенсорной информации. Эти процессы тесно связаны со способностью костистых рыб эффективно восстанавливать нервную ткань после повреждения. Изучение животных, способных к регенерации, полезно при исследовании постэмбрионального и репаративного нейрогенеза. В работе было использовано 60 годовалых особей молоди симы *Oncorhynchus masou*. Методом ИГХ маркирования бромдезоксифуридина (BrdU) были исследованы процессы пролиферации в различных зонах мозжечка молоди симы в норме и через три дня после нанесения механической травмы в дорсальную область тела мозжечка. В контроле и после повреждения в молекулярном и в гранулярном слоях мозжечка были идентифицированы BrdU+ клетки и, в некоторых случаях, BrdU+ ядра. Согласно классификации Траниелло учитывались два типа элементов, маркированные BrdU: клеточные ядра диаметром около 3.5 мкм и клетки диаметром около 5 мкм (Traniello et al., 2013). Наиболее крупное скопление BrdU+ клеток после травмы отмечалось в области прокола, в нижней трети молекулярного слоя дорсальной, латеральной и базальной зон и в гранулярном слое латеральной зоны мозжечка. Наличие большого количества BrdU+ клеток, возможно, указывает на то, что именно в этих зонах возникает максимальный пролиферативный ответ после травмы. Наиболее интенсивно BrdU-маркированные клетки располагались одиночно, на большом расстоянии друг от друга в толще молекулярного слоя, менее плотно окрашенные клетки формировали небольшие кластеры. В области прокола в среднем, в три раза увеличивалось число интенсивно окрашенных BrdU+ клеток по сравнению с интактными животными. Наибольшая плотность распределения маркированных клеток была характерна для поверхности молекулярного слоя дорсальной области, содержащей дорсальную матричную зону (ДМЗ). В этой зоне клетки формировали кластеры по 10–15 элементов, что не было характерно для интактного мозжечка. В гранулярном слое дорсальной зоны после нанесения травмы количество маркированных клеток двукратно превышало таковое в базальной и латеральной зонах. Во всех зонах интактного мозжечка выявлялись в небольшом количестве BrdU+ клетки, что свидетельствует о наличии процессов

персистентного нейрогенеза у молодежи симы. Наибольшее число BrdU+ клеток отмечалось в молекулярном и гранулярном слоях дорсальной зоны, в области, содержащей ДМЗ, и соответствующей зоне вторичного нейрогенеза. Данные BrdU-маркирования показали, что после повреждения значительно усиливаются процессы пролиферации. Наибольшая плотность BrdU+ клеток была выявлена в дорсальной зоне, содержащей ДМЗ и область прокола. В нижней трети молекулярного слоя отмечалось наибольшее число клеточных конгломератов, что, вероятно, свидетельствует о том, что данная зона обладает наибольшими потенциями к репарации.

Финансирование исследования: *Работа была выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-1-6-010) и гранта Президента (МД 4318.2015.4).*

**Суббот А.М., Габашвили А.Н., Нестерова Т.В.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»  
kletkagb@gmail.com

**ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ИЗ ТКАНЕЙ  
ПЕРЕДНЕГО ОТРЕЗКА ГЛАЗА  
КАК МАТЕРИАЛ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ  
И ОСНОВА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ  
ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
В ОФТАЛЬМОЛОГИИ**

**ВВЕДЕНИЕ.** Клеточная терапия в офтальмологии перестает быть фантастическим будущим, клеточные модели занимают свою нишу в исследовательских работах. Материалом служат как иммортализованные клеточные линии, так и первичные культуры, свойства которых наиболее близко соотносятся со статусом клеток *in vivo*. Широкое распространение технологий трансплантации роговицы делает относительно доступным биологический материал, из которого возможно получить первичные клеточные культуры. Задачей исследования было показать возможность получения клеточного материала из доступного послеоперационного и охарактеризовать его по ряду параметров.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Корнеосклеральные диски были получены из лаборатории консервации тканей ФГБНУ «НИИГБ». Образцы измельчали на фрагменты 2×2 мм и помещали в культуральный флакон (Corning) с площадью поверхности 25см<sup>2</sup>. Использовали ростовую среду DMEM/F12 (Gibco) с 10% сыворотки, культивировали в стандартных условиях. После миграции из фрагментов пассировали клетки с коэффициентом 1:4 с использованием 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco). Морфометрический анализ проводили с использованием программы ImageJ. Иммуноцитохимический анализ проводили для выявления специфичного для зрелого эпителия роговицы цитокератина 3 (Abcam, 1:750), для ЛСК — цитокератина 19 (Abcam, 1:20), для стромальных кератоцитов — виментина (Abcam, 1:750), для лимбальных МСК — CD90 (MiltenyiBiotec, 1:11). Вторичные антитела были с меткой Alexa555 (In vitrogen, 1:500), ядра докрашивали DAPI (In vitrogen, 1:400). Съемку проводили на микроскопах NikonA1 MP и ZeissAxioVert.A1. Для формирования многослойной клеточной системы клетки стромы роговицы выращивали на пористой мембране культуральных вкладок (ThinCert™ CellCultureInserts). Сканирую-

щая электронная микроскопия с лантаноидным контрастированием была проведена после применения набора реактивов «BioREE» (ООО Глаукон, Россия). Съемку вели на EVOL510, (ZEISS, Германия) в режиме EP (70 Па) при ускоряющем напряжении 27 кВ.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Клетки мигрировали из эксплантов и адгезировали к пластику, демонстрируя характерное для ЛСК и Л-МСК колониеобразование. В результате работы получена культура лимбального эпителия роговицы, стромальных фибробластов роговицы, смешанная культура ЛСК/ЛМСК. Морфометрический анализ показал характерные для этих типов клеток параметры. Подтвердили наличие цитокератина 3 в полученных эпителиоцитах, виментина в стромальных кератоцитах, маркеров стволовости (СК19 и CD90) в смешанной культуре ЛСК/ЛМСК. При культивировании кератоцитов на вкладках, ко второй неделе клетки сформировали многослойную систему толщиной 5–7 мкм, применимую для изучения патологии стромы, в частности — изучения биомеханики, что подтвердили исследования вязкопластических свойств полученной конструкции. Таким образом, показано, что полученные первичные клеточные культуры применимы для дальнейших исследований, как терапевтического плана, так и фундаментального.

**Субботина Т.Ф.<sup>1</sup>, Жлоба А.А.<sup>1</sup>,  
Смолина Н.А.<sup>2</sup>, Костарева А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова  
subbotina2002@mail.ru

**ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА  
СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ  
В ПРОЦЕССЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ И МИОГЕННОЙ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

Согласно немногочисленным исследованиям, в регуляции процессов роста и дифференцировки клеточных культур существенная роль отводится глутатиону (Ardite E. et al., 2004, Markovic J. et al., 2007). С другой стороны, мониторинг развития клеточных культур требует информативных маркеров состояния метаболизма клеток. Целью настоящей работы являлся поиск подобных маркеров из числа серосодержащих аминокислот и их производных, включая глутатион, а также других аминокислот, в особенности метаболически связанных с глутатионом (цистеин, глутамат). В качестве модели мы избрали процесс миогенной дифференцировки C2C12 миобластов — клеточной линии, дающей стабильные и хорошо воспроизводимые результаты. Миогенную дифференцировку клеток осуществляли согласно (Keire P. et al., 2013), с получением образцов культуральной среды на дни 0 (пролиферация), а также 2, 4, 7, 9 и 11 после индукции дифференцировки. Образцы анализировали методами ВЭЖХ для определения аминокислот, в том числе общего глутатиона (oГлт) (Zhloba A., Blashko E., 2004), а также спектра аминокислот, включая гомоаргинин (Zhloba A., Subbotina T., 2017). На основе сравнения выявленных концентраций с составом исходной среды рассчитывали суточную скорость высвобождения или потребления из среды соответствующих аналитов. Морфологически процесс дифференцировки оценивали иммуноцитохимически по появлению тяжелых

цепей миозина. Было обнаружено, что оГлт, отсутствующий в исходной культуральной среде, не высвобождается в нее в ходе пролиферативной фазы, но его образование достигает максимума на 4 день дифференцировки, сохраняясь вплоть до окончания эксперимента к 11 сут. Скорость высвобождения оГлт в культуральную среду достигает 50 нмоль/сут. Это сопровождается параллельной и практически эквимолярной динамикой потребления из среды основного субстрата глутатиона – цистеина. Между этими показателями выявляется сильная корреляционная зависимость ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,0001$ ), что указывает на синтез глутатиона как основной метаболический путь цистеина в условиях миогенной дифференцировки. Динамика других субстратов синтеза глутатиона – глутамата и глицина – не коррелирует с образованием глутатиона, что вполне объяснимо, учитывая многочисленность путей метаболизма этих аминокислот. Другая серосодержащая аминокислота гомоцистеин также высвобождается в среду, но в небольших количествах – до 4 нмоль/сут. на 2–4 день хода дифференцировки. Таким образом, образование глутатиона при дифференцировке миобластов наблюдается параллельно образованию миофибрилл миоцитов, являясь важным фактором поддержания их целостности и активности, возможно благодаря участию в глутатионилировании белков и в антиоксидантных реакциях.

Финансирование исследования: *Фонд РФФИ, грант № НК 15-04-02480.*

**Князева А.Р., Суворова И.И.**

*ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
irsuorov@yandex.ru*

**РЕСВЕРАТРОЛ УСИЛИВАЕТ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ**

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) в настоящее время представляют большой интерес в области регенеративной медицины, так как обладают уникальными свойствами – плюрипотентностью и способностью к самообновлению. Однако на сегодняшний день в процессе продолжительной экспансии ЭСК подвергаются спонтанной дифференцировке, что связано с изменениями в кариотипе культивируемых клеток. Поиск из числа малых молекул, которые могли бы дополнить протокол культивирования ЭСК в качестве компонентов, поддерживающих свойства плюрипотентности и самообновления, привел к исследованию действия ресвератрола на ЭСК мыши (мЭСК). На различных модельных объектах показаны противовоспалительное, антидиабетическое, антивирусное, антибактериальное и противоопухолевые свойства ресвератрола. В настоящее время уже синтезированы различные химические производные ресвератрола для более эффективного терапевтического воздействия. Таким образом, положительное влияние ресвератрола на большое число клеточных процессов позволило нам предположить, что указанное соединение может быть также полезно в положительной регуляции фундаментальных свойств ЭСК – самообновления и плюрипотентности. Количественная ОТ-ПЦР и вестерн блоттинг выявили повышенную экспрессию коровых маркеров плюрипотентности Oct3/4, Sox2, Nanog, Klf4, а также esrrb и prdm14 в мЭСК при действии ресвератрола. Анализ экспрессии поверхностного маркера SSEA1, ас-

социированного с плюрипотентностью показал регуляцию этого антигена в ресвератрол-обработанных мЭСК. Наблюдаемое окрашивание на щелочную фосфатазу мЭСК, культивируемых в присутствии ресвератрола, подтвердило положительное влияние ресвератрола на плюрипотентность клеток. Кроме того, мы обратили внимание на формирование более плотных колоний мЭСК при действии ресвератрола. Исследование влияния ресвератрола на структуру клеточных контактов, образованных N-кадгерином и  $\beta$ -катенином, выявило повышенную экспрессию этих белков на мембранах клеток. Таким образом, было показано, что ресвератрол положительно модулирует плюрипотентные свойства мЭСК, поддерживая их недифференцированное состояние. Исследование механизмов, обуславливающих наблюдаемые эффекты ресвератрола на мЭСК, выявило вовлеченность процесса аутофагии. Было показано, что образование аутофагосомных вакуолей увеличивается при действии ресвератрола уже в течение суток. Активация аутофагии подтвердилась повышенной экспрессией второй формы белка LC3-II, компонентом аутофагосомной мембраны, аккумуляцией Atg5/Atg12 и снижением количества белка p62/SQSTM1 в клетках, обработанных ресвератролом. Мы оценили mTOR-зависимый сигнальный путь, активация которого отрицательно регулирует аутофагию, и обнаружили, что добавление ресвератрола к мЭСК приводило к снижению ее активности, а также активности ее мишеней p70/S6, S6K и 4E-BP1. Киназа mTOR регулирует аутофагию через ингибирующее фосфорилирование ULK1, а ингибирование mTOR снижает ингибирующий уровень фосфорилирования ULK1 и увеличивает аутофагию. Соответственно, мы проанализировали уровень фосфорилирования ULK1 по ключевым а.к. остаткам, а также уровень активации киназы AMPK, которая усиливает аутофагию в ответ на истощение энергии, и показали, что ресвератрол индуцирует аутофагию в мЭСК через путь mTOR-ULK1, который включает в себя ингибирование киназы mTOR. Соответственно, можно предположить, что положительное влияние ресвератрола на плюрипотентность и самообновление мЭСК может быть обусловлено активацией аутофагии в том числе.

Финансирование исследования: *РФФИ № 16-04-01562А.*

**Суздальцева Ю.**

*ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России  
suesue@bk.ru*

**ММСК КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ**

Нарушение механизмов регенерации могут быть вызваны эпигенетическими изменениями, затрагивающими экспрессию широкого круга генов. Во взрослом организме заживление поврежденных тканей обычно происходит с образованием рубца, однако у плода до третьего триместра гестации, регенерация тканей происходит с полным восстановлением первоначальной архитектуры и функций. У взрослых предотвращение формирования рубца и смещение баланса в пользу регенерации требует принудительного вмешательства. Однако, молекулярные механизмы «фетальной регенерации» в настоящее время остаются практически неизвестными. Созда-

ние клеточных моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека позволит изучать особенности механизмов регенерации тканей на ранних стадиях развития организма. Ключевую роль в процессах воспаления и регенерации тканей играют мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). Сравнение функциональной активности предшественников и зрелых ММСК в условиях моделирования воспалительного микроокружения позволит идентифицировать ключевые молекулы и терапевтические мишени, играющие критическую роль в регуляции восстановления структуры и функций тканей человека. Было показано, что ММСК, выделенные из различных тканей человека, обладают сходными свойствами: способны к адгезии к пластиковой поверхности и экспансии в культуре в стандартных условиях, экспрессируют поверхностные маркеры CD105, CD90, CD73 и не экспрессируют CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR, способны дифференцироваться в адипоциты, остеобласты и хондроциты. Было обнаружено, что сокультивирование ММСК и активированных Т-лимфоцитов приводит к увеличению в ростовой среде концентрации IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Увеличение концентрации IFN- $\gamma$  происходило в условиях контактного сокультивирования ММСК с активированными Т-лимфоцитами, а увеличение концентрации TNF- $\alpha$  — в условиях бесконтактного сокультивирования этих клеток. Установлено, что в присутствии межклеточных контактов с активированными Т-лимфоцитами в ММСК активируется сигнальный путь STAT-1, приводящий к усилению синтеза IDO, а под действием TNF- $\alpha$  в ММСК активируется транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, приводящий к увеличению уровня экспрессии медиаторов воспаления COX-2, iNOS, IL-1, IL-8, CXCL2. Для создания клеточных моделей ИПСК человека под воздействием специальных условий были дифференцированы в клетки ранней мезодермы, которые экспрессировали маркеры BRY, Snail, TBX6, MIXL1 и поверхностный антиген CD90. Далее, посредством культивирования в стандартной среде эти клетки были дифференцированы в зрелые ММСК, сходные по характеристикам с постнатальными. Таким образом созданы клеточные модели предшественников и зрелых ММСК, дифференцированных из ИПСК человека, для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей на ранних стадиях развития человека. Изучение эпигенетических механизмов регуляции регенерации тканей на разных стадиях развития организма является необходимым этапом для разработки и создания новых лекарственных препаратов.

**Сулина Я.Ю.<sup>1</sup>, Люндуп А.В.<sup>1</sup>, Ищенко А.И.<sup>1</sup>, Александров Л.С.<sup>1</sup>, Баклаушев В.П.<sup>2</sup>, Пащенко А.А.<sup>1</sup>, Демченко А.Г.<sup>1</sup>, Абдуллаев Л.К.<sup>1</sup>, Клубуков И.Д.<sup>1</sup>, Ляшенко Ю.С.<sup>1</sup>, Крашенинников М.Е.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский клинический центр ФМБА России  
ya.suli.na@gmail.com

### **РАЗРАБОТКА КЛЕТЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ ФАЦИИ ТАЗОВОГО ДНА НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК И БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПРОЛАПСА ГЕНИТАЛИЙ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** В лечении тазового пролапса на сегодняшний день основным методом является хирургическое вмешательство. Наиболее низкий процент рецидивов во время операции пластики промежности наблюдается при использовании сетчатых имплантатов (5–40%), однако, имеются mesh-ассоциированные осложнения (2–10%). Учитывая данную тенденцию, возрос интерес к усовершенствованию применяемых имплантатов путем создания на их поверхности слоя аутологичных клеток *in vitro* для восстановления фасциальных дефектов тазового дна.

**ЦЕЛЬ.** Изучить биосовместимость клеточно-инженерных конструкций на основе биодеградируемых и биоиндеградируемых матриц с аутологичным клеточным компонентом (ДФ) при имплантации крысам Вистар.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В качестве матриц КИК использовали образцы изделий размерами 10×10 мм из сетки ProleneMesh (полипропилен, ETHICON), Випро II (композит из полилактогликолида с полипропиленом, ETHICON), икриловую сетку VM94 (полилактогликолид, ETHICON), биологический имплантат Pergacol (свиной дермальный коллаген, Sofradim) и титановую сетку (ООО НПФ «Темп»). Клеточный компонент конструкции состоял из аутологичных фибробластов (2–3 пассажи) крыс Вистар, выделенных из фрагментов кожи размером 5×5 мм, культивированных в стандартных условиях и посеянных в концентрации 4×10<sup>5</sup> клеток на каждый образец каркаса. Клеточный монослой формировался на каркасах в течение 2–3 нед. Динамика формирования КИК подтверждалась при помощи световой микроскопии (NikonTE-2000U). Жизнеспособность полученных конструкций оценивалась с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (CarlZeiss) с окраской LIVE/DEAD. Имплантации конструкций животным проводили в условиях операционной центрального вивария Сеченовского университета. Крысам Вистар (n = 12) в фасциальное пространство межлопаточной области в сформированные карманы устанавливалось по 4 КИК. Контролем служили каркасы без клеток у 4 крыс. Сроки контроля — 7, 14, 21 сут. Проведено гистологическое (гематоксилин + эозин) и ИГХ (Coll3a, Casp9, Casp3, CD31, Vcl2, CD31) имплантированных КИК. Результаты. Получены 5 различных типов КИК в условиях *in vitro*, в которых клеточный компонент был представлен аутологичными ДФ (жизнеспособность — 84–95%). Вначале происходило покрытие нитей сеток, далее — закрытие ячеек сетки (поры 0.5×0.5 мм), формируя многослойное клеточное



покрытие. На матриксе Permacol отмечалось равномерное покрытие ДФ с частичным проникновением внутрь материала. Наиболее цитосовместимым каркасом по оценке динамики формирования клеточного компонента был Permacol. Тканевая реакция на посаженных контрольных сетках и КИК была различной. При образовании клеточного монослоя отмечалась менее выраженная воспалительная реакция (конструкции проращены соединительной тканью, макрофаги и гигантские клетки немногочисленны) и формировалась зрелая соединительная ткань.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** ИГХ находятся в процессе морфометрической оценки.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Оценка предварительных результатов показала, что *in vitro* возможно создание различных КИК фасции с многослойным жизнеспособным клеточным компонентом, каркасом для которых являются имплантаты, применяемые в гинекологии. Данные конструкции пригодны для имплантации, не вызывают отторжения и формируют *in vivo* более зрелую соединительную ткань — основной функциональный компонент фасции.

Финансирование исследования: *Данная научно-исследовательская работа проведена в рамках внутривузовского гранта Первого МГМУ им. И.М. Сеченова № 14.604.21.0133 (RFMEFI60414X0133) (январь-декабрь 2015 г).*

**Суровцева М.А.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>,  
Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Чернявский А.М.<sup>1,2</sup>,  
Фомичев А.В.<sup>1</sup>, Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>,  
Ким И.И.<sup>1,2</sup>, Карева Ю.Е.<sup>1</sup>, Таркова А.Р.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>2</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Институт цитологии и генетики СО РАН  
mfelde@ngs.ru

### **ЭФФЕКТ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК, КО-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕЦЕПТОР К ЭРИТРОПОЭТИНУ, У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

Терапия больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) стволовыми клетками (СК) является перспективным направлением, но ее эффективность зависит от выживаемости имплантированных в миокард стволовых клеток. Известно, что эритропоэтин способен повышать выживаемость клеток при гипоксии. Целью исследования стала оценка эффекта preconditionирования костномозговых мононуклеарных клеток (КМ-МНК) с эритропоэтином на фенотип и жизнеспособность КМ-МНК. Исследование проведено у 30 больных в возрасте 45–74 лет, с ишемической болезнью сердца с функциональным классом сердечной недостаточности по NYHAII-III класса. КМ-МНК выделяли на градиенте плотности фикоколл/верографин из аспирата костного мозга клетки и preconditionировали с эритропоэтином (33,4 МЕ/мл) в течение 60 мин. Фенотип КМ-МНК, до и после инкубации с эритропоэтином, исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII с использованием моноклональных антител, к CD31, CD34, CD45 и CD184, а также к рецептору эритропоэтина. В популяции CD34+ клеток, до и после инкубации с эритропоэтином, исследовали клеточный цикл с использованием пропидиума иодида и апоптоз с ис-

пользованием AnnexinV-FITCApoptosisDetectionKit. Среди КМ-МНК больных ХСН выделены гемопоэтические стволовые клетки (CD45+/CD34- клетки), эндотелиальные прогениторные клетки (CD34+, CD31+, CD133+, VEGFR-2+ клетки) и мезенхимные стволовые клетки (CD73+, CD90+, CD105+ клетки). Показано, что кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином приводила к значимому увеличению гемопоэтических стволовых клеток с фенотипом CD45+/EpoR+, снижению количества эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34+/CD133+ и CD34+/EpoR-, и не влияла на количество — CD34+/EpoR+. Кроме этого, инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует увеличению пула клеток с фенотипом CD31+/CD184+. Показано увеличение количества CD34+ клеток в фазе покоя/начального роста (G0G1) за счет уменьшения доли клеток в фазе подготовки к митозу/митоза (G2/M) и фазе синтеза/репликации (S) после инкубации с эритропоэтином. Таким образом, preconditionирование КМ-МНК с эритропоэтином, способствует увеличению пула CD34+ клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки и созревания, и задержке клеток в фазе покоя/начального роста.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (Заявка № 16-15-00057).*

**Сучков Д.И., Павлов А.В.**

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России  
argoncs@mail.ru

### **СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИНКУБИРОВАННОГО ИЗМЕЛЬЧЕННОГО КОРАЛЛА РОДА АСГОРОГА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ НАКОСТНОГО ОСТЕОСИНТЕЗА**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Закрытие костных дефектов после оперативных вмешательств является рутинной проблемой современной медицины. Однако поиск наиболее соответствующих всем требованиям и в то же время экономически выгодных костнозамещающих материалов ведется и в настоящее время.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Разработать перспективный способ подготовки пломбировочной массы, состоящей из измельченного коралла. Задачи исследования: 1) апробация разработанного способа; 2) изучение скорости репаративного остеогенеза.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В качестве пломбировочной массы использовали измельченный коралл рода *Asgoroga* (размер гранул 98–400 мкм), предварительно инкубированный с цельной кровью опытного животного в течение 12 ч. при температуре 4°C в стерильных условиях (Приоритетная справка № 2017104014 (007092) от 07.02.2017). В качестве погружного накостного остеосинтеза использовали устройство, состоящее из полувтулок — прижимной и фиксирующей (Приоритетная справка № 2016121487 (033652) от 31.05.2016). В эксперимент были взяты 12 идентичных лабораторных крыс самцов стока Wistar. Все животные были разделены на две равные группы — опытную и контрольную. Всем крысам латерально в проекции бедренной кости выполняли оперативный доступ, с помощью циркулярной фрезы формировали критический дефект кости (7±0,2 мм) с полным обнажением костно-

мозгового канала. В контрольной группе дефект пломбировали измельченным кораллом, смешанным с аутокровью непосредственно перед помещением в рану. В опытной группе дефект пломбировали разработанным способом. Бедренную кость фиксировали предложенной моделью погружного накостного остеосинтеза. Рана ушивалась послойно наглухо. Животных, по 3 крысы из каждой группы, выводили из эксперимента путем передозировки средств для наркоза на 15-е и 30-е сут. Далее производили вычленение бедренной кости с дальнейшей фиксацией, удалением фиксирующего устройства и гистологическим исследованием (гематоксилином и эозином и по способу Маллори).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Все животные восстановили функциональную активность оперированной конечности к 5-м сут. При морфологическом исследовании на 15-е сут. в опытной группе отмечалось образование полей незрелой костной ткани с заполнением более 50% от площади дефекта, так же визуализировались сосуды и участки молодой хрящевой ткани. Пустоты от растворенного коралла варьировали в пределах 70–180 мкм. В контрольной группе, в отличие от опытной группы, отмечались участки воспалительной инфильтрации, пустоты от растворенного коралла варьировали в пределах 82–270 мкм. На 30-е сут. в опытной группе отмечалось полное заполнение костного дефекта с формированием остеонов, пустоты от коралла составили 27–130 мкм. В контрольной группе остеоны не визуализировались, заполнение дефекта составило до 60%. Пустоты составили 56–195 мкм.

**ВЫВОДЫ.** Коралл рода *Acropora* обладает остеиндуктивным и остеокондуктивным эффектами. Предложенный способ положительно влияет на скорость репаративного остеогенеза и не требует пробы на биосовместимость.

**Сысоева В.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.,  
Дыйканов Д., Калинина Н.И., Ткачук В.А.**

*Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
veroniks@mail.ru*

#### **ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НЕСТИН КЛЕТОК В ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА**

Нестин — один из маркеров клеток — потомков нервного гребня, которые сохраняются в тканях взрослого организма в качестве стволовых и участвуют в регенерации тканей. Локализация и функции этих клеток в жировой ткани, а также их роль в регенерации не исследованы. Целью работы было охарактеризовать нестин-экспрессирующие клетки жировой ткани *in vivo* и *in vitro* с точки зрения их стволовости и гормональной регуляции. В работе были использованы мыши, у которых под нестиновым промотором экспрессируется флуоресцентный зеленый белок GFP. Таким образом, весь пул нестин-экспрессирующих клеток в жировой ткани можно было проследить *in vivo* и *in vitro*. На тотальных препаратах и толстых срезах жировой ткани мыши окрашенных антителами против CD31 (маркер эндотелия), NG2,  $\alpha$ SMA и PDGFR $\beta$  обнаружены группы, цепочки и единичные нестин-экспрессирующие клетки локализованные как периваскулярно, так и в строме между зрелыми адипоцитами. В тоталь-

ной популяции МСК (мезенхимных стволовых/стромальных клеток), выделенных из жировой ткани по стандартному протоколу, доля нестин-экспрессирующих клеток составляет 5–10% и незначительно сокращается ко 2–3 пассажу. В составе гетерогенной популяции МСК нестин-экспрессирующие клетки способны пролиферировать и мигрировать «в экспериментальную рану». Отсортированные нестин-экспрессирующие клетки способны давать клоны и дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Иммуноцитохимический анализ выявил экспрессию маркеров, характерных для мышечных мезенхимных стромальных и стволовых клеток. Таким образом, нестин-экспрессирующие клетки обладают характеристиками стволовых. Ранее мы показали способность отдельных клеток в составе гетерогенной популяции МСК отвечать на гормоны (Kotova et al., 2014) и обнаружили транзитное увеличение чувствительности отдельных клеток в ответ на действие катехоламинов (Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Была высказана гипотеза, что именно стволовые клетки в составе гетерогенной популяции МСК обладают способностью усиления чувствительности в ответ на действие гормона, однако анализ ответа нестин-экспрессирующих клеток на катехоламины не выявил в них повышения внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Можно предположить, что исследуемая популяция нестин-позитивных клеток задействует другой механизм внутриклеточной передачи сигнала в ответ на действие гормонов.

Финансирование исследования: *Исследование поддержано Российским Научным Фондом грант № 14-15-00439.*

**Тазетдинова Л.Г., Соловьева В.В.,  
Мартынова Е.В., Гомзикова М.О.,  
Ризванов А.А.**

*Казанский (Приволжский) федеральный  
университет  
safinalays@gmail.com*

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЗАГРУЖЕННЫХ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН**

Известно, что стромальное микроокружение играет важную роль в опухолевой прогрессии. Иммунные и стромальные клетки, присутствующие в опухолевых нишах, способствуют росту опухоли, ее васкуляризации и метастазированию. В недавних исследованиях было показано, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) имеют естественный тропизм к опухолевым нишам и могут служить перспективным вектором для адресной доставки противоопухолевых агентов, в частности, химиотерапевтических препаратов, в места локализации опухоли. Цисплатин является одним из эффективных цитотоксических лекарственных средств и используется для лечения различных видов опухолей. В настоящей работе исследован цитокиновый профиль и противоопухолевая активность *in vitro* МСК, выделенных из жировой ткани человека и загруженных препаратом цисплатин. МСК выделяли путем ферментативной обработки жировой ткани человека с использованием 0,2% раствора коллагеназы. Цитофлуориметрический анализ на приборе FACSAriaIII с использованием специфичных антител показал, что выделенные МСК экспрессировали маркеры стволовой мезенхимной клетки, такие

как CD44 (97,8%), CD73 (99,4%), CD90 (93,4%), CD29 (96,5%), CD166 (86,2%) и не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR – 0,95%). Для загрузки МСК была выбрана нетоксическая концентрация цисплатина 5 мкг/мл (Cisplatin-Ebewe), которую подбирали с помощью MTS-теста. После загрузки клетки трипсинизировали, отмывали от препарата и переносили в новый культуральный флакон. Через 48 часов инкубации собирали кондиционированную среду и наносили ее на клетки нейробластомы SH-SY5Y. Было показано, что жизнеспособность SH-SY5Y после инкубации с кондиционированной средой загруженных МСК снизилась на 20% по сравнению с контрольными клетками в обычной культуральной среде и клетками в кондиционированной среде от нативных МСК. Для изучения молекулярных особенностей МСК и исследования секреции хемокинов/цитокинов был проведен мультиплексный анализ кондиционированной среды загруженных клеток и нативных МСК с использованием набора Bio-PlexProHumanCytokine 21-plexAssay (BioRad) на приборе Luminex 200. Концентрации каждого анализа была рассчитана с использованием стандартной кривой. Показано, что у загруженных цисплатином МСК в кондиционированной среде значительно повышается уровень следующих анализов по сравнению с нативными клетками: IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-16, HGF, MIF, SCF, SCGF- $\beta$  и TRAIL. Данные цитокины участвуют в пролиферации и дифференцировке различных клеток, а TRAIL способен вызывать апоптоз опухолевых клеток. Таким образом, показана противовоспалительная активность МСК, загруженных цисплатином, в отношении опухолевых клеток SH-SY5Y. Полученные результаты указывают на перспективность метода доставки химиотерапевтических препаратов с использованием МСК. Анализ цитокинового профиля загруженных МСК в дальнейшем позволит понять возможные механизмы их взаимодействия с опухолевыми клетками в стромальном микроокружении.

Финансирование исследования: Работа финансировалась грантом РФФИ № 16-34-60201 и программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

**Тамкович С.Н.<sup>1</sup>, Сомов А.К.<sup>1</sup>, Сагарадзе Г.Д.<sup>2</sup>,  
Туганов О.С.<sup>1</sup>, Карпущина К.В.<sup>1</sup>,  
Клемешова Д.И.<sup>3</sup>, Юнусова Н.В.<sup>4</sup>,  
Власов В.В.<sup>1</sup>, Центалович Ю.П.<sup>5</sup>,  
Ткачук В.А.<sup>2</sup>, Лактионов П.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>4</sup> Институт Онкологии Томского НИМЦ

<sup>5</sup> ФГБУН «Институт «Международный томографический центр» СО РАН  
s.tamk@niboch.nsc.ru

### **АНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКСОСОМ**

Известно, что позитивные эффекты, получаемые от имплантации стволовых клеток зачастую опосредованы секретлируемыми ими везикулами, которые могут транспортироваться не только к близлежащим клеткам, но и с током биологических жидкостей в отдаленные ткани и органы. Таким образом, исследование транспорта и эффектов микровезикул входят

в число актуальных задач Регенеративной медицины. В представленной работе была исследована ангиогенная активность экзосом, циркулирующих в плазме крови и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови (АФЭК) здоровых доноров (ЗД). Экзосомы крови клинически ЗД выделяли методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. Размер и количество везикул определяли при помощи анализатора частиц MalvernNS300, экспрессию поверхностных тетраспатинов подтверждали проточной цитофлуориметрией. Ангиогенную активность везикул оценивали с помощью методики образования капилляроподобных структур (микротрубочек) эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) на Матригеле, обедненном ростовыми факторами (GrowthfactorreducedMatrigel, BDBioSciences). Суммарную длину микротрубочек в лунке измеряли в 8 случайно выбранных полях зрения. Подсчет выполняли с помощью программного обеспечения (ПО) ImageJ. Экзосомальные белки идентифицировали методом MALDI-TOF, поиск соответствующих кандидатов проводили в аннотированных базах данных SwissProt с использованием ПО Mascot. Клеточная локализация и молекулярные функции экзосомальных белков были проанализированы с помощью ПО FunRich (Function enrichment analysis tool, <http://www.funrich.org/>). Полученные из плазмы ЗД экзосомы по данным трекового анализа имели размер  $96 \pm 16$  нм, суммарные экзосомы крови (везикулы плазмы + АФЭК везикулы) –  $130 \pm 5$  нм. По убыванию MFI в крови были идентифицированы следующие субпопуляции везикул:  $CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD9/CD63 = CD24/CD63$ , что подтверждает их экзосомальную природу и преимущественное происхождение из эндотелиальных и гемопоэтических клеток. Добавление  $4 \times 10^9$  экзосом из плазмы крови ЗД к  $2 \times 10^4$  клеток HUVEC приводит к стимуляции формирования микротрубочек, а добавление суммарных экзосом крови – к ингибированию их формирования. В первом случае суммарная длина микротрубочек по сравнению с контролем возрастает на 59%, во втором случае – снижается на 60%, соответственно. По данным MALDI-TOF, в экзосомах плазмы про-ангиогенные белки представлены в 2 чаще (FN1, C3, FGF10, HAND1 и др), чем в суммарных экзосомах крови. Наиболее представлены в составе экзосом крови белки мембран и цитоплазмы (22 и 21% соответственно), ранее идентифицированные экзосомальные белки (20%) и белки крови (19%). Белки экзосом преимущественно вовлечены в процессы транспорта (24%), межклеточные взаимодействия, метаболизм белков и иммунный ответ (по 12%). Таким образом, популяции экзосом крови отличаются по ангиогенной активности: экзосомы плазмы крови обладают про-ангиогенным эффектом, в то время как АФЭК экзосомы ингибируют ангиогенез.

**Таширева Л.А., Савельева О.Е., Денисов Е.В.,  
Булдаков М.А., Исаева А.В., Завьялова М.В.,  
Перельмутер В.М.**

НИИ онкологии, ФГБНУ «Томский национальный  
исследовательский медицинский центр» РАН  
lkleptsova@mail.ru

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СУБПОПУЛЯЦИЙ  
ОДИНОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК В ТКАНИ РАКА МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ И СВЯЗЬ С ЛИМФОГЕННЫМ  
МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Опухолевые стволовые клетки (ОСК) являются субпопуляцией, наделенной опухоль-иницирующими свойствами. Однако и им присуща гетерогенность, в силу чего на сегодняшний день не существует универсального маркера стволовости, и нет четкой связи с их ролью в развитии метастазов, в том числе и при РМЖ (Yang F. et al., 2016). Некоторые маркеры, такие как CD133, CD166, CD44, CD24 и активность ALDH1, показали свою состоятельность для идентификации ОСК во многих солидных опухолях (Medema J P., 2013). Однако экспрессия данных маркеров ОСК не является однородной между типами опухолей. При исследовании стволовых клеток при РМЖ обычно не обращается внимание на локализацию в различных по величине и форме многоклеточных структурах опухоли или их наличие как одиночных клеток. Между тем, одиночные опухолевые клетки, по-видимому, с большей вероятностью могут осуществлять интраваскулярную и становиться «семенами» для метастазирования. В настоящем исследовании изучена экспрессия одиночными опухолевыми клетками рака молочной железы маркеров стволовости CD133 и CD44/CD24, а также оценена связь с наличием лимфогенных метастазов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование было включено 56 больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Средний возраст пациентов составил  $51,67 \pm 8,46$ . По молекулярно-генетическому типу опухоли распределились следующим образом: люминальный В – 42%, трижды негативный – 38%, Her2-позитивный – 20%. Образцы фиксированного опухолевого материала были окрашены антителами против CD44 (v6 clone VFF7, Novocastra, Leica, Германия), CD24-PE (NovusBio, США), CD133 (clone 3F10, 1:800, MyBioSource, USA) и CK7 (clone N-20, SantaCruze, USA) и проанализированы с помощью конфокального микроскопа LSM780 (CarlZeiss, Germany). Результаты. Для РМЖ описано наличие пяти типов структур, формируемых опухолевыми клетками. Среди них выделяют одиночные опухолевые клетки (Завьялова М.В. и др., 2006). В результате проведенного исследования было показано, что одиночные CD44+CD24- клетки в опухоли присутствуют в 32% случаев. Количество CD44+CD24- клеток среди одиночных опухолевых клеток было достоверно ниже ( $p = 0,0001$ ) по сравнению с многоклеточными структурами опухоли (от 11 до 9%) и равнялось 1%. В свою очередь частота встречаемости CD133+ одиночных опухолевых клеток равнялась 70%, а их количество –  $5,45(0,56-16,70)\%$ . Было показано, что в группе больных с наличием лимфогенных метастазов количество CD133+ одиночных опухолевых клеток достоверно ниже ( $p = 0,043$ ), при этом количество CD44+CD24- клеток не различалось ( $p = 0,27$ ). Что касается связи

стволовых клеток многоклеточных структур с лимфогенным метастазированием, то ранее (Денисов Е.В. и др., 2017) нами было показано, что количество CD44+CD24- клеток в разных многоклеточных структурах РМЖ одинаковое.

**ВЫВОДЫ.** Количество одиночных опухолевых стволовых клеток, оцениваемое с помощью маркеров CD133 и CD44/CD24, различается. С лимфогенным метастазированием связаны CD133+ одиночные опухолевые клетки.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-15-10221).*

**Тенчурин Т.Х.<sup>1</sup>, Шепелев А.Д.<sup>1</sup>,  
Мамагулашвили В.Г.<sup>1</sup>, Дюжева Т.Г.<sup>2</sup>,  
Людуп А.В.<sup>2</sup>, Крашенинников М.Е.<sup>2</sup>,  
Клабуков И.Д.<sup>2</sup>, Гомзяк В.И.<sup>1</sup>,  
Крашенинников С.В.<sup>1</sup>, Бузин А.И.<sup>1</sup>,  
Чвалун С.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский Институт»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России  
tenchurin.timur@mail.ru

**ТКАНЕИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ЖЕЛЧНОГО  
ПРОТОКА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ  
ПОЛИМЕРОВ: МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА,  
ДЕГРАДАЦИЯ IN VITRO, ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ  
ФАКТОРАМИ РОСТА**

Интерес к использованию биodeградируемых материалов в качестве билиарных стентов обусловлен их способностью к разложению в естественных условиях, включению в состав стенки протока, возможностью создания заданных условий деградации, функционализации материала и формирования на их основе тканеинженерной конструкции. Методом электроформования получены каркасы желчного протока (ЖП) из растворов поликапролактона (ПКЛ), сополимера D,L-лактида с гликолидом (ПЛДГА), сополимера L-лактида с ε-капролактоном (ПЛК). Проведено исследование процесса деградации каркасов в зависимости от их молекулярного состава и характера жидкой фазы. Обнаружено, что волокнистые материалы на основе ПКЛ обладают наибольшей устойчивостью к гидролизу. Вне зависимости от характера жидкой фазы существенных массовых потерь ПКЛ образцов, помещенных в них, в течение 140 дней не обнаружено. При этом средневесовая молекулярная масса ПКЛ начинает снижаться только через 70 дней. По своим прочностным и упругим свойствам, которые практически не меняются в процессе деградации, каркасы на основе ПКЛ соответствуют механическим характеристикам децеллюляризованного ЖП в наибольшей степени. За аналогичный промежуток времени каркасы на основе ПЛК и ПЛДГА больше склонны к гидролизу, что видно из увеличения массовых потерь и значительного снижения средневесовой молекулярной массы. При этом по модулю Юнга и относительному удлинению каркасы на основе ПЛДГА и ПЛК существенно отличаются от децеллюляризованного ЖП. На основе результатов исследования деградации плоских образцов изготовлены многослойные конструкции ЖП. Внутренний и барьерный слой получены из ПКЛ, а внешние слои из ПЛДГА и ПЛК. Полученные образцы заселялись клетками в статичном и дина-

мическом режиме. В результате проведенных работ показано отсутствие цитотоксичности у изготовленных материалов и выбраны наиболее подходящие для заселения фибробластоподобными и эпителиальными клетками трехмерные конструкции. Одной из причин недостаточной биологической совместимости синтетических материалов в качестве тканеинженерных конструкций является недостаточность обеспечения адекватного клеточного окружения. Для модификации каркасов использовали эпидермальный фактор роста и препарат «Неоваскулген». Растворы биологически активных веществ в фосфатном буфере вводили в состав прядильных растворов на основе хлороформа, содержащих 1% плюроника F-127. Биосенсорный анализ, проведенный на клеточном анализаторе iCelligence (ACEA, США), показал, что модифицированные каркасы, стимулируют пролиферацию культур эпителиальных клеток in vitro.

Финансирование исследования: *Настоящая работа была выполнена при поддержке соглашения о субсидии № 14.604.21.0133 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0133) и благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства г. Москвы*

**Гершович П.М.<sup>1</sup>, Маркова В.А.<sup>1</sup>,  
Белозерова Н.С.<sup>1</sup>, Карабельский А.В.<sup>1</sup>,  
Иванов Р.А.<sup>1</sup>, Петухов А.В.<sup>2</sup>, Титов А.К.<sup>2</sup>,  
Моторин Д.В.<sup>2</sup>, Бутылин П.А.<sup>2</sup>,  
Зарицкий А.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ВIOCAD*

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова altitovO@gmail.com*

#### **ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ ANTICD19-CAR-КЛЕТОК**

Одним из перспективных направлений в лечении В-линейных опухолей является CAR-T-терапия. CAR-T представляет собой Т-лимфоцит, в геном которого внедрен ген CAR (химерного антигенного рецептора). Внеклеточный домен данного рецептора обеспечивает распознавание мишени (например, CD19), а внутриклеточный – активирует CAR-T, что ведет к уничтожению клетки-мишени. В данном исследовании нами были получены CAR-T и исследована их цитотоксичность.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Т-клетки периферической крови здорового донора культивировались на среде OptiMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицин, 300 ЕД/мл рекомбинантного человеческого IL-2 и 2 мкл DynabeadsHumanT-Activator. Через 48 ч. культура подвергалась вирусной трансдукции лентивирусным препаратом, содержащим гены CAR, специфичного к CD19, пептида RIAD для усиления активационного сигнала и репортерного белка GFP для оценки эффективности трансдукции.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Жизнеспособность Т-лимфоцитов на 3 день после проведения трансдукции лентивирусным препаратом достигала 91,87%. Экспрессия репортерного белка GFP в жизнеспособных Т-лимфоцитах составляла 50,87%. При культивировании в среде, содержащей IL-2 без добавления специфического активатора (rCD19), количество CAR-T через 120 ч. снижается в 1,5 раза относительно их числа через 48 ч. культивирования, в то

время как в присутствии rCD19 (2 мкг/мл) количество CAR-T через 120 ч. увеличивается в 1,4 раза относительно 48 ч. Для оценки цитотоксических свойств CAR-T их культивировали совместно с двумя линиями клеток-мишеней: K562-CD19- (контрольная линия без экспрессии CD19) и K562-CD19+ (оверэкспрессоры CD19). Изначальное соотношение Т-лимфоцитов и клеток-мишеней составляло 1:1, по 50%. После 48 часов культивирования CAR-T с клетками K562-CD19- количество CAR-T снижалось до 36,2%. В случае культивирования CAR-T с клетками K562-CD19+ процент CAR-T увеличивается до 57% и 84,5% после 48 и 120 ч. экспозиции соответственно. Жизнеспособность клеток-мишеней через 120 ч. культивирования заметно снижалась в экспериментальной группе, по сравнению с контрольной (3,5% против 36,74%). Жизнеспособность и GFP-позитивность CAR-T в экспериментальной группе составила 78,98% и 45,79% соответственно.

#### **ВЫВОДЫ.**

1. Лентивирусный вектор эффективно трансдуцировал Т-лимфоциты и практически не влиял на их жизнеспособность при последующем культивировании.

2. Общее количество CAR-T в присутствии rCD19 возрастало по сравнению с контрольной группой.

3. При со-культивировании CAR-T с K562-CD19+ наблюдалась активная элиминация и снижение жизнеспособности CD19 позитивных клеток-мишеней при значительном и устойчивом превалировании CAR-T в смешанной популяции клеток.

Получение потенциально практически применимых CAR-T является первым шагом к развитию технологии адаптивной иммунотерапии в Российской Федерации. В настоящее время нами также реализуется стратегия, направленная на снижение токсичности CAR-терапии и получение аллогенного off-the-shelf препарата.

**Титова А.А., Мавликеев М.О.,  
Мартынова Е.В., Шафигуллина А.К.,  
Гаранина Е.Е., Чернова О.Н., Певнев Г.О.,  
Гумерова А.А., Ризванов А.А., Киясов А.П.**

*ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
anjerika@list.ru*

#### **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МЫШЦ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС**

Распространенность хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) увеличивается с каждым годом, что стимулирует интерес к терапевтическому ангиогенезу. Внедрение генно-клеточной терапии ХОЗАНК в клиническую практику требует доклинических исследований для лучшего понимания механизмов терапевтического эффекта. Целью нашего исследования был комплексный анализ процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровне, после введения нативных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ), ММСК ЖТ, трансдуцированных vegf165 (VEGF165-ММСК ЖТ) или ММСК ЖТ, трансдуцированных одновременно vegf165 и sdf1a (VEGF165-SDF1A-

ММСК ЖТ) в икроножную мышцу крысам с моделью ишемии задних конечностей. ММСК ЖТ выделяли из жировой ткани крыс, трансдуцировали рекомбинантными лентивирусами, кодирующими *veg165* или *veg165+sdf1a* вместе с трансдукцией *egfr*. После хирургической индукции ишемии задних конечностей в икроножную мышцу вводили  $2 \times 10^6$  VEGF165-ММСК ЖТ, VEGF165-SDF1A-ММСК ЖТ или нативных ММСК ЖТ в 200 мкл физраствора. Проводили забор икроножной и камбаловидной мышц оперированной и интактной задних конечностей на 3, 7, 14, 21 и 28 сут. после введения, часть материала замораживали в парах жидкого азота для проведения мультиплексного анализа (MILLIPLEXkit) гомогенатов мышечной ткани, часть ткани фиксировали в 10% забуференном формалине с последующей заливкой в парафин по стандартной методике для проведения патогистологического анализа. Патогистологический анализ выявил замедленный репаративный рабдомиогенез в условиях отсутствия избыточной экспрессии факторов роста. В группе с нативными ММСК ЖТ на 28-й день мы обнаружили значительное увеличение количества молодых мышечных волокон ( $33,63 \pm 6,25\%$  против  $12,72 \pm 2,00\%$  против  $6,98 \pm 1,37\%$  в группах с VEGF165-ММСК ЖТ и VEGF165-SDF1A-ММСК ЖТ соответственно,  $p < 0,05$ ), скорости пролиферации (доля Ki-67+ ядер  $18,23 \pm 2,03\%$  против  $6,65 \pm 1,29\%$  против  $4,53 \pm 0,82\%$ ,  $p < 0,05$ ) и уровня экспрессии кавеолина-1 ( $4,18 \pm 0,89$  против  $0,59 \pm 0,21$  против  $1,38 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ), известного как ингибитор дифференцировки миообластов. Относительная площадь соединительной ткани к 28-му дню в группе с нативными ММСК ЖТ была заметно увеличена ( $10,06 \pm 1,75\%$  против  $1,54 \pm 0,12\%$  против  $1,93 \pm 0,28\%$ ,  $p < 0,001$ ), это было связано с тем, что на 21-й день значительно увеличился уровень экспрессии профиброгенных хемокинов: фактора роста соединительной ткани ( $4,23 \pm 0,03$  против  $1,41 \pm 0,16$  против  $0,67 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$ ), TIMP-1 и tPAI-1. Паттерны экспрессии про/противовоспалительных цитокинов IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$ , GRO/CXCL11 демонстрировали противовоспалительный потенциал генетически модифицированных ММСК ЖТ. Трансдукция ММСК лентивирусами, несущими гены *veg165* и *sdf1a*, улучшает их терапевтический потенциал за счет ингибирования фиброгенеза, воспалительной реакции и стимуляции репаративного рабдомиогенеза при их введении в икроножную мышцу на модели хронической ишемии задних конечностей у крыс.

**Тихобразова О.П.<sup>1</sup>, Балябин А.В.<sup>2</sup>,  
Гладков А.А.<sup>1</sup>, Муравьева М.С.<sup>3</sup>, Клюев Е.А.<sup>1</sup>,  
Тимашев П.С.<sup>4</sup>, Баграташвили В.Н.<sup>4</sup>,  
Мухина И.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Минздрава России

<sup>3</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

<sup>4</sup> Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН  
olga.tikhobrazova@gmail.com

#### **ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ 3D БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СКАФФОЛДА НА ФУНКЦИИ ЦНС МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПРИ ТЕРАПИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ**

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает дегенерацию и гибель клеток в центральной нервной системе. Отсутствие на сегодняшний день существенных успехов в эффективности медикаментозной терапии, ограниченный регенеративный потенциал головного мозга в отношении восстановления нервных клеток вызывают необходимость разработки новых методов лечения ЧМТ. Одним из наиболее перспективных методов терапии ЧМТ является нейротрансплантация стволовых или прогениторных клеток на основе 3D носителей или синтетических биodeградируемых материалов, а также разработка адекватных носителей для трансплантируемых клеток, которые бы создавали определенное микроокружение при длительном процессе восстановления нейронных сетей и поддерживали дефект до восстановления структуры ткани. Однако клинические и экспериментальные эффекты трансплантации клеток, создающих подходящую для регенерации тканей и нейротрансплантации среду, изучены недостаточно. На модели открытой ЧМТ мозга мышей линии C57BL/6 изучена способность аутологичных нейральных стволовых клеток обонятельного эпителия на основе 3D биodeградируемого скаффолда, состоящего из гидрогеля высокомолекулярной гиалуроновой кислоты и модифицированного хитозана, выполняющего роль носителя трансплантируемых клеток и замещающего матрикс нервной ткани при проведении реконструктивной терапии, к восстановлению функций головного мозга. Трансплантация аутологичных стволовых клеток обонятельного эпителия на основе 3D биodeградируемого скаффолда в очаг повреждения через 7 сут. после травмы мозга оказывала протекторное действия, восстанавливая неврологический статус животных (шкала оценки неврологического дефицита), а также двигательные (тест «открытое поле») и когнитивные функции (условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ), тест распознавания нового объекта). Имплантация аутологичных стволовых клеток обонятельного эпителия на основе 3D биodeградируемого скаффолда приводило к полному восстановлению неврологических функций у животных через 1 год после ЧМТ. Происходило достоверное восстановление двигательных реакций и функций, связанных с поддержанием равновесия в сравнении с контролем. Имплантация через 1 нед. после моделирования ЧМТ в очаг повреждения аутологичных стволовых клеток

обонятельного эпителия на основе 3D биодegradуемого скаффолда оказывало оптимизирующее действие на способность животных к обучению УРПИ на 10 сут., восстанавливало функции гиппокамп зависимой кратковременной памяти, а также способствовало актуализации следов долговременной памяти в отдаленном посттравматическом периоде. Методом высокопольной МРТ показано достоверное уменьшение объема очага повреждения. По данным МРТ, поддержание объема мозга в посттравматическом периоде за счет нейротрансплантации в течение первого месяца, предупреждало нарушение работы нейронных сетей мозга, что обуславливает лучшее восстановление когнитивных и рефлекторных функций ЦНС в отдаленном посттравматическом периоде.

Финансирование исследования: *Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Проект № RFMEFI60715X0117).*

**Тихомирова И.А., Малышева Ю.В.,  
Потемина А.С.**

*Ярославский государственный педагогический университет*  
tikhom-irina@yandex.ru

#### **ОБНОВЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ПУЛА КРОВИ И ПРОЦЕСС СТАРЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ**

Будучи основным клеточным компонентом крови, эритроциты играют центральную роль в перфузии тканей, процессах газообмена. Популяция эритроцитов находится в постоянном движении — около 2 млн клеток в секунду выходят в кровоток из костного мозга и примерно такое же их количество удаляется из циркуляции. Продолжительность жизни эритроцитов человека составляет около 120 дней, после чего «старые» эритроциты удаляются из циркуляции посредством эритрофагоцитоза. Поддержание баланса между утилизацией клеток крови и их воспроизводством является одним из важнейших условий нормального функционирования сердечно-сосудистой системы. К настоящему времени накоплены экспериментальные свидетельства того, что кроме классической газотранспортной функции эритроциты выполняют ряд «неканонических» функций, участвуя в синтезе, захвате и высвобождении NO, в регуляции кровотока с учетом локальных потребностей тканей посредством высвобождения биологически активных соединений (АТФ). Кроме того, от количества и биофизических свойств эритроцитов во многом зависят реологические свойства крови, влияющие и на системную гемодинамику. Снижение числа эритроцитов — анемия — полиэтиологичная патология, однако вне зависимости от ее причин и формы, установлена ассоциация анемии с сердечно-сосудистыми осложнениями. Пациентам с тяжелыми формами анемии необходимо переливание крови, однако, как показывает клиническая практика, гемотрансфузия зачастую сопровождается побочными эффектами (такими как тромбозмобилия, аллергическая реакция, лихорадка, рост артериального давления и т.д.) и неблагоприятным исходом основного заболевания. Отчасти эти негативные эффекты обуславливаются изменениями биохимических, биофизических и молекулярных свойств эритроцитов в процессе хранения крови. При этом происходит ис-

кусственное (вне циркуляции) «старение» красных клеток крови, сопровождающееся нарушением их мембранных и функциональных свойств. Известно, что старение эритроцитов в процессе циркуляции *in vivo* и при хранении крови сопровождается потерей воды, 2,3 — ДФГ, АТФ, протеинов, гемоглобина, снижается их энзиматическая активность, изменяется симметрия фосфатидилсерина, формируются везикулы, что ведет к уменьшению клеточного объема, поверхностного заряда и повышению плотности клеток. При этом снижается не только кислородтранспортная функция, но страдают микрореологические и «неканонические» функции эритроцитов — ухудшается их деформируемость, растет агрегируемость, снижается синтез NO, повышается хрупкость мембраны, что ведет к нарушению их целостности, высвобождению гемоглобина, который является одним из серьезных патофизиологических факторов сердечно-сосудистых осложнений (гемолиз-ассоциированных тромбозов, эндотелиальной дисфункции и т.д.). Поэтому изучение биологических механизмов и биомаркеров старения эритроцитов приобретает важное значение как для целей оптимизации гемотрансфузии, так и в оценке функциональных возможностей циркулирующих эритроцитов и процессов обновления клеточного пула крови.

**Ткачук В.А.**

*Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
Институт регенеративной медицины  
МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова*  
tkachuk@fbm.msu.ru

#### **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ**

Обновление органов и тканей у человека и животных происходит постоянно в течение всей жизни за счет пролиферации зрелых соматических клеток, дифференцировки стволовых клеток и перепрограммирования дифференцированных клеток. За счет этого в течение жизни человека в организме обновляются тонны клеток, поддерживающих физиологические функции, а при повреждении — регенерацию ткани.

Процессы обновления и регенерации находятся под контролем нервной и эндокринной систем, а также паракринного действия факторов роста и цитокинов. В последние годы обнаружена новая регуляторная система, играющая ключевую роль в процессах дифференцировки и дедифференцировки клеток, а также их перепрограммирование. Это так называемые регуляторные РНК, структура которых определяется некодирующей частью генома. Расшифровка генома человека показала, что кодирующая часть ДНК (определяющая структуру белков) составляет около 1–2%, а более 95% молекулы ДНК несет регуляторную информацию. Именно эти регуляторные РНК определяют состояние хроматина, активность транскрипционных факторов, процессы дифференцировки клеток и их дедифференцировки.

Благодаря этим открытиям появились новые возможности воздействия на процессы обновления и регенерации тканей. Особую роль данные механизмы могут играть в процессах развития организма, формирования пластичности и репарации после повреждения.

В докладе будут обсуждаться механизмы участия стволовых клеток в регенеративных процессах, в том

числе за счет так называемого «горизонтального переноса» генетической информации. Последний реализуется при участии секреторируемых везикул, содержащих, помимо факторов роста, как кодируемые (мРНК), так и не кодируемые (малые) РНК. Будут представлены данные о роли паракринных факторов, секреторируемых мезенхимными стромальными клетками (МСК), в процессах роста и созревания сосудов и нервов. По схожему механизму МСК способны активировать перепрограммирование дифференцированных клеток, минуя потенциально опасное состояние плюрипотентности.

Раскрытие этих механизмов обновления и регенерации тканей открывает широкие возможности для создания нового направления в современной терапии и хирургии, которое получило название «регенеративная медицина».

**Толстоухов В.С.<sup>1</sup>, Никишин Д.В.<sup>1</sup>,  
Ефимова И.В.<sup>2</sup>, Баулин А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Пензенский государственный университет

<sup>2</sup> ООО «Центр доклинических исследований»  
tolstoukhovvs@gmail.com

#### **БИОЛОГИЧЕСКИ ИНЕРТНЫЙ ПОЛИМЕР ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ОСНОВЕ КЕРАТИНА**

На сегодняшний день в реконструктивной медицине используется большое количество трансплантатов, имеющих биологическое происхождение. Всё большую популярность приобретают материалы, изготовленные из тканей животных. Как правило, в качестве сырья используются: телячий и свиной перикард, подслизистая основа тонкой кишки, твердая мозговая оболочка, дерма, надкостница. Основным структурным компонентом всех этих тканей является коллаген. Эти материалы могут выполнять роль, как биологических протезов, так и мембран для направленной регенерации. Несмотря на все преимущества подобных трансплантатов, всегда остается открытым вопрос о качестве обработки сырья, ведь все вышеперечисленные ткани, содержат в себе то или иное количество клеточных элементов, способных при интеграции в организм реципиента вызвать ответную иммунную реакцию. Нами был разработан биологический полимер, ранее не используемый в подобных областях, структура которого представлена волокнами белка-кератина. Природный кератин для создания материала изготавливается путем переработки сырья, полученного от птицефабрик. Основным преимуществом данного трансплантата является то, что материал не содержит в себе клеточных структур, что позволяет исключить из цикла обработки децеллюляцию и применение агрессивных реактивов (ферменты, глутаровый альдегид), способных вызвать иммунный ответ при попадании в организм. Кератин является полностью биоинертным белком, что дает возможность к проведению имплантации без последующего удаления пластины, не опасаясь образования грубоволокнистой соединительной ткани. Барьерную мембрану на основе кератина можно использовать в качестве материала для закрытия дефектов в различных областях реконструктивной медицины. Была проведена доклиническая апробация материала на лабораторных крысах. Кератиновые пластины устанавливались под кожу экспериментальных животных. По результатам исследования выявлено, что трансплантат биоинер-

тен, не отторгается и не является причиной образования грубоволокнистой соединительной ткани в области имплантации. Напротив, волокна кератина окружаются тонким слоем фибробластов, собственная соединительная ткань не прорастает между волокнами имплантата. Во второй серии экспериментов пластина на основе кератина была проверена на устойчивость к воспалительному процессу. На лабораторных животных была смоделирована ситуация, когда трансплантат находился между интактными участками тканей и инфицированными. По результатам гистологических исследований установлено, что мембрана на основе кератина способна выполнять барьерные функции и препятствовать распространению воспалительного процесса. Даже на поздних сроках вывода целостность трансплантата под воздействием воспаления, не была нарушена, и мембрана продолжала выполнять барьерную функцию. Все это позволяет сделать вывод о том, что дальнейшее исследование и производство ксеноматериалов на основе кератина актуально и востребовано в различных областях реконструктивной хирургии.

Финансирование исследования: *Собственные средства.*

**Трубицына И.Е., Абдулатипова З.,  
Орлова Ю.М., Васнев О.С., Гуляев А.С.**

Московский клинический научный центр  
им. А.С. Логинова ДЗ г. Москвы  
ie.trubitsyna@gmail.com

#### **УЧАСТИЕ МСК В ЗАЖИВЛЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ РАНЫ ЖЕЛУДКА**

**ВВЕДЕНИЕ.** Раневую поверхность начинает покрывать грануляционная ткань, которая выполняет защитную и регуляторную роль. Участие МСК в фазах воспаления не ясна. Смена фаз воспаления имеет четкую последовательность. Избыточное присутствие клеток воспаления может замедлять переход к последующей фазе и нарушать процессы регенерации, привести к затяжному воспалению. Иммунная система играет огромную роль в поддержании и трансформации реакции воспаления.

**ЦЕЛЬ.** Изучить результативность, безопасность и иммуномодулирующий эффект трансплантации аллогенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при заживлении послеоперационного шва железистой части желудка у крыс. Работа выполнена на модели послеоперационной раны желудка. Моделирование проводили на белых крысах обоего пола, содержащихся в виварии на смешанном рационе питания со свободным доступом к воде. Оперативное вмешательство проводилось под эфирным наркозом. За 18 ч. до оперативного вмешательства у крыс убирали корм, оставляя свободный доступ к воде. У наркотизированных животных по средней линии вскрывали переднюю брюшную стенку. По большой кривизне в железистой зоне тела желудка производилась продольная резекция 2/3 желудка. Культия желудка ушивалась двурядным швом. Желудок погружался в брюшную полость. Передняя брюшная стенка ушивалась. Использовано 66 белых крыс обоего пола. Было выполнено 2 серии опытов: первая серия трансплантация крысам на 3-и сут. после операции однократно в дозе  $3,5 \times 10^6$ . Во второй серии опытов клетки вводили крысам дважды в дозе  $3,5 \times 10^6$  клеток на 3-и и 8-е сут. после операции. Контрольная серия опытов: первая —



животным проводили операцию на желудке, после которой одно- или двукратно вводили физиологический раствор 0,5 мл. Вторая – внутрибрюшинное введение МСК или физиологического раствора интактным животным, без операции.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Установлено, что в 1–5 сут. отмечается высокое содержание серотонина (5-НТ) в слизистой оболочке зоны оперативного вмешательства, которое коррелирует с повышением уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови ИЛ-1 ( $r = 0.82, p < 0.001$ ) и ФНО- $\alpha$  ( $r = 0.87, p < 0.001$ ) и ИФ- $\gamma$  ( $r = 0.88, p < 0.001$ ). После трансплантации МСК отмечено повышение уровня противовоспалительного ИЛ-4 на 50% ( $p < 0.05$ ) и снижение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 на 30% ( $p < 0.05$ ), ФНО- $\alpha$  на 35 ( $p < 0.05$ ), ИФ на 38% ( $p < 0.05$ ), что является прогностически благоприятным маркером для регенерации послеоперационной раны желудка. Трансплантация МСК безопасна и не имеет побочных эффектов, как у здоровых животных, так и в послеоперационном периоде. Использование МСК может быть рекомендовано для клинического использования при оперативных вмешательствах на органах ЖКТ. После трансплантации МСК отсутствуют контрактуры в зоне послеоперационного шва стенки желудка, что обеспечивает качественное заживление операционной раны железистой части желудка и отсутствие нарушения пассажа желудочного содержимого.

Финансирование исследования: *Бюджет.*

**Тюкавин А.И.<sup>1</sup>, Белостоцкая Г.Б.<sup>2</sup>,  
Захаров Е.А.<sup>3</sup>, Буркова Н.В.<sup>1</sup>,  
Мирошниченко В.Ю.<sup>4</sup>, Самарин С.А.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России

<sup>4</sup> Медицинская академия им. С.И. Георгиевского atuykavin@mail.ru

#### **MECHANISM OF CONJUGATION OF THE FUNCTIONS OF CARDIAL AND MESENCHYME STEM CELLS IN THE MYOCARDIUM**

**RELEVANCE.** The mechanisms of interaction of resident cardiac and mesenchymal stem cells of the bone marrow (KSK, MSCCM) in tissues remain largely unclear.

**PURPOSE.** To evaluate the role of apoptotic bodies of cardiomyocytes (ApTK) and fibroblasts (ApTF) in conjugation of functions of KSK and MSCCM. Materials and methods. Influence of ApT on cardiomyogenesis was studied in the model of cardiomyogenesis from KSK (c-kit+, Sca+, Isl1+). Myocardial infarction (MI) caused in Wistar and Wistar-Kayoto rats. Emigration of MSCCM to the myocardium after MI was studied by in situ hybridization on the Y chromosome. The directional migration of the MFC1 with the GFP tag was studied in C57BL / 6 mice. Cell preparations and tissue sections were examined by confocal microscopy. Myocardial contractility was evaluated ex vivo by Langendorf.

**RESULTS.** It was shown that the co-cultivation of myocardium and apTK cells accelerated the proliferation and differentiation of CSC in the colony. The frequency of reduction of colonies after 3 weeks

of co-cultivation increased in comparison with the control by more than 1.5 times. ApTF had no effect on cardiomyogenesis. After the administration of ApTK to rats with postinfarction heart failure, the contractility of the ventricle was increased by 30% 3 weeks after the infarction. Injections of ApTK into the “old” rats caused an increase in myocardial contractility to values characteristic of the heart of “young” animals. ApTF inhibited contractility of the myocardium. It was shown that ApTK was activated in the myocardium by the restoration of a pool of cardiomyocytes (c-kit+,  $\alpha$ -Actinin), and ATTF stimulated the development of clones from which the endothelium is formed (Sca+, CD 105). It is shown that the MSCMM of males injected into females after MI was detected in the perifocal zone of damage outside the vessels and in the wall of newly formed vessels. In ex vivo experiments, laser doses were identified that caused predominantly apoptosis (I) or necrosis of cells (II). It was shown that after irradiation of (I) tissues and administration of MSCCM with GFP in a day, mesenchymal cells accumulated in the laser exposure zone. With the use of (II), the transfer of MQCM from the bloodstream to the tissue was not observed.

**CONCLUSIONS.** It seems that the functions of KSK and MSCCM in the zones of myocardial regeneration are interfaced by means of Atp cells. On the surface of Atp there are signal molecules that determine the directed movement of MSCCM into the zone of apoptosis, and inside Atp there are biologically active compounds that carry the tissue-specificity code of the dead cell.

**Умбаев Б.А., Олжаев Ф.С., Масуд А.,  
Садырбеков Д.Т., Шрамко А.Ю., Цой А.К.,  
Сафарова Ю.И., Омарова Д.А.,  
Аскарова Ш.Н.**

National Laboratory Astana,  
Назарбаев Университет  
bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И ПОЛОКСАМЕРА 407**

Полимерные системы с иммобилизованным в них биологическим материалом находят все более широкое применение в медицине. В последнее время особое внимание исследователей привлекают так называемые термочувствительные полимерные гидрогели, которые способны изменять свое агрегатное состояние в ответ на изменение температуры окружающей среды. Нами была разработано раневое покрытие на основе модифицированного N-акрилоил-6-аминогексановой кислотой полксамера 407, способного к термореактивному гелеобразованию, и лиофилизированной амниотической мембраной человека в качестве активного биологического материала. В настоящем исследовании была проведена оценка ранозаживляющих свойств данного раневого покрытия в условиях in vivo с использованием модели полнослойных плоскостных ран у мышей линии CD-1. В качестве препаратов сравнения использовали мази: «Левомиколь» и «Сульфаргин». Для создания модели полнослойного плоскостного раневого дефекта производили иссечение полнослойного кожного лоскута округлой

формы до 8 мм в диаметре с последующим наложением силиконовых фиксаторов. Оценку регенерации раны проводили путем измерения площади раны и с помощью гистологического анализа. Результаты исследования показали, что полимерногидрогелевое раневое покрытие на основе амниотической мембраны и полоксамера 407 приводит к более ускоренной регенерации раны в сравнении с контролем и препаратами сравнения.

Финансирование исследования: *Грант Министерства образования и науки Республики Казахстан 4339/ГФ4, 2015-2017 гг.*

**Усольцева Е.О., Гзгзян А.М., Ниаури Д.А.,  
Джемлиханова Л.Х.**

*Санкт-Петербургский государственный  
университет  
usolceva.elena@inbox.ru*

### **ХОУМИНГ КСЕНОГЕННЫХ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПОВРЕЖДЕННЫЙ И ИНТАКТНЫЙ ЭНДОМЕТРИЙ**

Миграция и хоуминг стволовых клеток в поврежденную ткань являются неотъемлемой составной частью их терапевтического действия. Конкурентная тропность стволовых клеток к различным тканям зачастую усложняет интерпретацию механизмов и закономерностей клеточной миграции. Цель исследования — оценка миграции и хоуминга ксеногенных эндометриальных стволовых клеток в экспериментально поврежденный и интактный эндометрий. Протокол моделирования экспериментального повреждения эндометрия состоял из имплантации общехирургическими методами участков аутологичного эндометрия на париетальную брюшину экстрогонизированных кроличьих породы Шиншилла ( $n = 16$ ). Модельным животным производилась внутривенная инфузия 20–40 мкл суспензии эндометриальных стволовых клеток, выделенных из менструальной крови здоровых женщин, концентрацией 50 тысяч клеток/мкл ( $n = 8$ ) или фосфатно-солевой буфер в равном объеме ( $n = 8$ ). Оценка экспрессии маркеров мезенхимальных стволовых клеток CD90 и CD105 в перитонеальных имплантатах эндометрия и эндометрии интактного маточного рога производилась с использованием иммуногистохимического метода на 10 сут. после трансплантации эндометриальных стволовых клеток или введения фосфатно-солевого буфера. Во всех образцах эндометрия перитонеальных имплантатов и интактного рога экспериментальных животных после введения суспензии эндометриальных стволовых клеток определялась экспрессия маркеров CD90 и CD105. Относительная площадь экспрессии маркера CD90 в образцах перитонеальных имплантатов эндометрия ( $n = 70$ ) составила  $12,20 \pm 0,30\%$ , в образцах интактного эндометрия ( $n = 20$ ) —  $6,99 \pm 0,35\%$ . Относительная площадь экспрессии маркера CD105 в образцах перитонеальных имплантатов эндометрия ( $n = 70$ ) составила  $7,27 \pm 0,12\%$ , в образцах интактного эндометрия ( $n = 20$ ) —  $9,17 \pm 0,36\%$ . В образцах имплантатов эндометрия и интактного эндометрия животных после введения фосфатно-солевого буфера ( $n = 66$  и  $n = 16$  соответственно) экспрессия маркеров CD90 и CD105 не определялась. В ходе эксперимента показано, что введенные системно эндометриальные стволовые клетки мигрируют как в ткань поврежденного в ходе опе-

рационной процедуры гетеротопичного эндометрия, так и в ткань интактного аутопичного эндометрия. Различия в относительной площади экспрессии маркеров CD90 и CD105 в поврежденном и интактном эндометрии ( $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно) на 10 день после введения клеточного продукта, возможно, являются следствием пластичности эндометриальных стволовых клеток в различающихся условиях тканевого микроокружения поврежденного и интактного эндометрия.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках гранта Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2190.*

**Фадеев Ф.А.<sup>1</sup>, Сулимов А.В.<sup>2</sup>, Луговец Д.В.<sup>1</sup>,  
Губаева О.В.<sup>1</sup>, Сазонов С.В.<sup>1</sup>,  
Леопольдович Л.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»*

<sup>2</sup> *Детская городская клиническая больница № 9,  
Екатеринбург  
fdf79@mail.ru*

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

В современной регенеративной медицине важное место занимает использование дермальных фибробластов человека для восстановления целостности кожных покровов. Методика ускорения заживления ран с помощью аллогенных фибробластов применялась в России в Институте хирургии им. А.В. Вишневского. По соглашению с данным учреждением, в Екатеринбурге на базе Детской городской клинической больницы № 9 осуществляется внедрение этой методики. Методика предполагает использование дермального эквивалента, представляющего собой полимерную пленку «Карбосил-П» с адгезированными на ее поверхности аутогенными фибробластами. Клиническое использование фибробластов требует получения большого количества клеток и, в то же время, приведения этого процесса в соответствие требованиям GMP. Для получения больших объемов клеточного материала в нашей лаборатории используется технология автоматизированного культивирования клеток с помощью роботизированной станции ComracTSelect. Культуру фибробластов выделяли из биоптата кожи пациента. Клетки подвергали пересеву в течение 2–3 пассажей, после чего высевали их на полимерные матрицы «Карбосил-П». Через 3 дня полученный дермальный эквивалент отмывался от ростовой среды физиологическим раствором для клинического применения. С помощью роботизированной станции ComracTSelect нами был автоматизирован этап накопления биомассы аутогенных фибробластов. Процедура выделения фибробластов из первичного материала и заключительный этап посева накопленных клеток на полимерные матрицы автоматизации не подлежали вследствие ограничений функциональных возможностей станции и осуществлялись вручную. Технология автоматизированного культивирования была использована при получении фибробластов для лечения ожогов кожи IIIA и IIIB степени. Все операции проводились при наличии информированного согласия со стороны родителей пациентов. Биоптат кожи брали на 7-е сутки

после ожога во время перевязки под общим обезболиванием. Все операции с клетками производились в течение 3–4 нед.. Контроль биологической безопасности культуры (тесты на стерильность, а также на наличие HIV-1, -2, HBV, HCV, HCMV, EBV, HSV-1, -2) осуществляли на последнем пассаже перед посевом клеток на полимерные матрицы. Аппликация матрицы «Карбосил-П» с адгезированными на ней аутогенными фибробластами осуществлялась при выполнении операции аутодермопластики. Матрица удалялась на следующей перевязке. Начало эпителизации отмечалось приблизительно на 4-е сут. после нанесения матрицы. На 7-е сут. рану обрабатывали суспензией фибробластов, что дополнительно стимулировало эпителизацию раны. Завершение эпителизации отмечалось приблизительно на 11 сут. Наблюдалось полное приживление использованных для аутодермопластики кожных лоскутов, на месте аппликации фибробластов не отмечено формирования грубых рубцовых деформаций. Полученный результат продемонстрировал принципиальную возможность использования роботизированной станции CompactSelect для накопления биомассы фибробластов для клинического применения.

**Фатхудинов Т.Х.<sup>1</sup>, Арутюнян И.В.<sup>1</sup>,  
Цедик Л.В.<sup>2</sup>, Тенчурин Т.Х.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава

<sup>2</sup> Институт порошковой металлургии

<sup>3</sup> Курчатовский институт  
tfat@yandex.ru

### **ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ ХИРУРГИЧЕСКИЙ ПРОТЕЗ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ ПОЛОСТЕЙ ТЕЛА**

Частота рецидивов и протез-ассоциированных осложнений при использовании современных синтетических и биологических материалов для пластики дефектов полостей тела остается крайне высокой. Можно утверждать, что на сегодняшний день не существует идеального хирургического протеза. Поэтому разработка синтетического полностью резорбируемого хирургического протеза близкого по уровню физико-механических свойств к нерезорбируемым синтетическим протезам, а по своей биосовместимости близкого к биологическим протезам, может быть эффективным способом решения этой проблемы. Проведены научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы по исследованию физико-химических и медико-биологических свойств целого ряда длительно резорбируемых синтетических полимерных материалов. На основании проведенных экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* определены наиболее биосовместимые и эффективные по химическому составу и морфологии скаффолды. Получены экспериментальные образцы и разработаны прототипы медицинских изделий, которые представляют собой тканеинженерные хирургические протезы на основе полидиоксанаона и поли-ε-капролактона. Разработаны методы эффективного заселения скаффолдов стромальными и эпителиальными клетками для воспроизведения гистологической структуры стенки полых органов покрытых или выстланных слизистой оболочкой. На экспериментальной модели полнослойного дефекта передней брюшной полости у крыс была проде-

монстрирована высокая безопасность и эффективность разработанных тканеинженерных конструкций по сравнению с близкими аналогами, широко применяющимися в клинической практике.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00281).*

**Федоренко Т.В., Гилевич И.В.,  
Коломийцева Е.А., Порханов В.А.**

ГБУЗ «НИИ – Краевая клиническая больница № 1»  
им. проф. С.В. Очаповского»

fedorenko.tv@mail.ru

### **АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** На пролиферативную активность клеток оказывает влияние способ культивирования, тип питательных сред и сывороток. При выборе добавок к средам руководствуются требованиями инфекционной безопасности и отсутствием аллергических реакции. Саплимент должен обеспечивать жизнеспособность, низкий апоптотический индекс и сохранять функциональные свойства клеток.

**ЦЕЛЬЮ** работы являлась сравнительная оценка влияния лизата тромбоцитов (ЛТ) различной концентрации на пролиферативную активность и жизнеспособность фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Фибробласты и ММСК человека были выделены ферментативным методом и культивированы в одинаковых стандартных условиях, в питательной среде DMEM (Gibco, США) и 100 ед/мл антибиотика-антимикотика. В качестве добавки использовали: 1) 10% сыворотка человека (СЧ) – положительный контроль; 2) 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,1% ЛТ – опытные образцы. Лизат тромбоцитов был приготовлен из пула лейкоцитомоноцитарного слоя активных доноров, путем двукратного центрифугирования с последующей глубокой заморозкой фракции тромбоцитов. Пролиферативную активность оценивали по среднему времени удвоения клеток. Цитотоксичность и жизнеспособность были оценены при помощи МТТ-теста.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В результате исследования получены достоверные данные сокращения времени удвоения на 7,4 ч. ( $p < 0,05$ ) при использовании питательной среды с 10% и 5% ЛТ. Количество клеток, культивируемых в питательной среде с 10% ЛТ и с 5% ЛТ, больше, чем в случае применения питательной среды с 10% аутологичной СЧ в 3,19 и 2,91 раз соответственно, что подтверждает факт повышения пролиферативной активности с ЛТ. Результаты МТ-теста показали, что клетки метаболически активны и ЛТ не оказывает цитотоксического действия на фибробласты и ММСК. Жизнеспособность рассчитывали относительно положительного контроля (100%) и наблюдали увеличение выживаемости клеток с 10% ЛТ ( $100,8 \pm 4,35\%$ ) и 5% ЛТ ( $105,5 \pm 1,92\%$ ). По результатам исследования достоверных отличий между 10% ЛТ и 5% ЛТ не выявлено. Дополнительно были проведены цитогенетические исследования, которые показали отсутствие aberrаций и сохранение нормального кариотипа во всех пробах.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, сравнительный анализ показал эффективность использования в ка-

честве добавки к питательной среде 10% или 5% ЛТ для культивирования фибробластов и ММСК, что было доказано повышенной пролиферативной активностью клеток, сохранением их жизнеспособности и нормального кариотипа человека. Культивирование фибробластов и ММСК таким способом может быть рекомендовано для разработки биомедицинского клеточного продукта.

**Федотовских Г.В., Шаймарданова Г.М., Аскаргов М.Б., Сапаргуль М.**

АО «Национальный научный медицинский центр»  
gvf\_fedotovskikh@mail.ru

#### **УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Как известно, аутологичные клетки костного мозга больных с хронической патологией характеризуются снижением биорегуляторной активности и мало пригодны для клеточной терапии. Поэтому, важную роль при их трансплантации приобретает процесс предварительного прекультивирования, повышающего функциональную активность клеточного материала (Шумаков В.И., Онищенко Н.А., 2009). Целью настоящей работы являлась оценка на ультраструктурном уровне морфо-функционального состояния прекультивированных клеток костного мозга больных с аутоиммунными заболеваниями. После клинико-лабораторного обследования 33 больных с системной склеродермией и первичным билиарным циррозом печени была проведена аспирация костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 400 мл. Биотехнологическим методом выделена мононуклеарная фракция клеток костного мозга с последующим прекультивированием в течение 24 ч. Для электронномикроскопического исследования клетки фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида с постфиксацией в 1% растворе четырехокиси осмия. Исследования проводились по общепринятой методике и заключались в эпон. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином (С. Humphrey, F. Pittman, 1974). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, исследовали и сохраняли в электронном микроскопе Libra 120 (С. Zeiss). Как показала световая микроскопия высокого разрешения прекультивирование не изменяло состав клеток костного мозга. Ультраструктура лимфоцитоподобных клеток характеризовалась признаками восстановления энергетической функции митохондрий и повышением секреторной активности эндосом. Клетки различных подклассов гранулоцитарного ряда содержали многочисленные гранулы различных типов. Кроме того, были отмечены клетки с аномальной агрегацией ядерного хроматина и признаками аутофагии на различных стадиях аутолиза. Таким образом, прекультивирование клеток костного мозга больных с аутоиммунной патологией восстанавливало энергетическую функцию митохондрий, повышало секреторную активность эндосом и способствовало удалению поврежденных клеток.

**Фигуркина М.А.<sup>1</sup>, Михайлова Е.В.<sup>2</sup>, Малеков Д.А.<sup>1</sup>, Соколова М.О.<sup>1</sup>, Александров В.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН

<sup>3</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова»

mariya.figurkina@mail.ru

#### **ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННАЯ ТКАНЬ ТРАХЕИ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ЕЕ ОКОНЧАТЫХ ДЕФЕКТОВ**

Рост числа ларинготрахеостомий предопределяет необходимость поиска материала для реконструктивно-пластических операций у детей и взрослых, отвечающего требованиям физико-химической надежности, химической и биологической безопасности, а также биосовместимости. Целью работы стало изучение процесса регенерации при пластике дефекта передней стенки трахеи аллогенной децеллюляризированной тканью (ДЦТ) трахеи. В работе использовали самцов Wistar (массой 150 г, n = 7). Искусственный окончатый дефект размером 9 мм<sup>2</sup> по передней поверхности трахеи закрывали ДЦТ, полученной детергентно-ферментным способом с контролем остаточного количества ДНК. Оценку регенерации проводили в динамике на 1 и 6 мес. посттрансплантационного периода с использованием стандартных методов гистологического окрашивания. В качестве контроля использовали участок интактной трахеи. У животных не отмечали признаков развития дыхательной недостаточности. Через 1 мес. наблюдали закрытие внутренней поверхности трансплантата эпителием и активный процесс рецеллюляризации в толщине трансплантата. Через 6 мес. макроскопически место дефекта определяли только по остаткам шовного материала по его периферии. Компьютерная томография подтвердила отсутствие стеноза. Микроскопически в толщине ткани отмечали появление групп клеток, морфологически напоминающих клетки хрящевой ткани. Таким образом, показаны быстрая рецеллюляризация трансплантата органоспецифическими клетками пациента, что, возможно, свидетельствует о низкой цитотоксичности материала, и сохранности сигнальных молекул, а также способности ДЦТ инициировать процесс дифференцировки репопулирующих ее клеток с формированием естественных тканевых структур. Это позволяет говорить о принципиальной возможности использования для пластики ларинготрахеальных дефектов ДЦТ, не несущей риски, связанные с использованием искусственных твердых материалов, сетчатых эндопротезов, ауто трансплантатов, и, что особо важно, отказаться от необходимости повторных реконструктивных операций у детей вследствие интеграции ДЦТ с тканями реципиента и росту вместе с ростом ребенка.

**Филатов М.А.**

МГУ им. М.В. Ломоносова  
maxfilat@yandex.ru

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОВАРИАЛЬНЫХ  
ФОЛЛИКУЛОВ В АЛЬГИНАТНЫХ  
ГИДРОГЕЛЯХ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ СМЕНОЙ  
КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД**

Одной из важнейших на сегодняшний день ещё не до конца решённых задач современных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является создание систем культивирования, позволяющих получать в результате культивирования ткани яичника или единичных овариальных фолликулов зрелые способные к оплодотворению ооциты. Разработка подобных систем позволит проводить процедуры по сохранению фертильности среди женщин, страдающих от различных онкологических и аутоиммунных заболеваний, лечение которых требует применения агрессивных методов терапии (таких, например, как химио- и лучевая терапия), которые оказывают негативное воздействие на состояние женских половых клеток, приводя к развитию бесплодия. В рамках данной работы в качестве модельного объекта использовали овариальные фолликулы мыши диаметром от 130 до 150 мкм. Фолликулы выделяли механическим путём из яичников мышей в возрасте 21–23 дней. Выделенные фолликулы помещали в раствор альгинатного гидрогеля, после чего производили его полимеризацию в растворе хлорида кальция. Затем производили индивидуальное культивирование капель альгинатного гидрогеля с инкапсулированными в него фолликулами в культуральной среде, содержащей  $\alpha$ -МЕМ, эмбриональную телячью сыворотку, инсулин-трансферрин-селенит, гентамицин, фолликулостимулирующий гормон, L-карнитин, аскорбиновую кислоту. Культивирование производили при +37°C, в атмосфере 5%CO<sub>2</sub>/воздух. Смену культуральной среды производили каждые 48 ч. При достижении фолликулом стадии Граафоваго пузырька производили замену культуральной среды на среду, содержащую  $\alpha$ -МЕМ, эмбриональную телячью сыворотку, инсулин-трансферрин-селенит, гентамицин, фолликулостимулирующий гормон, L-карнитин, хорионический гонадотропин, эпидермальный фактор роста. Через 24 ч. после культивирования в данной среде извлекали из фолликулов ооциты механическим путём с помощью игл от инсулиновых шприцов. Затем полученные ооциты подвергали процедуре ЭКО. Нами было показано, что созданная система культивирования овариальных фолликулов *in vitro* поддерживает рост последних. Более того, 82% ооцитов, выделенных из овариальных фолликулов после культивирования *in vitro* способны к инициации мейоза, а 52% ооцитов достигают стадии МIII. Также было показано, что после проведения оплодотворения наблюдается формирование двух пронуклеусов. Также, в единичных случаях было показано развитие оплодотворенных ооцитов до стадии двух бластомеров. Разработанная система культивирования овариальных фолликулов позволяет поддерживать рост фолликулов и созревание в них ооцитов. Однако полученные таким образом ооциты имеют пониженную компетентность к дальнейшему развитию. Поэтому дальнейшее развитие систем культивирования фолликулов яичника является одной из важнейших задач современных ВРТ.

Финансирование исследования: Работа под-держана Российским научным фондом (проект № 14-50-00029).

**Филиппенков И.Б.<sup>1</sup>, Ставчанский В.В.<sup>1</sup>,  
Денисова А.Е.<sup>2</sup>, Иванова К.А.<sup>3</sup>,  
Лимборская С.А.<sup>1</sup>, Дергунова Л.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

<sup>3</sup> Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова  
filippenkov@img.ras.ru

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ НЕКОДИРУЮЩИХ  
РНК ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ  
С НЕЙРОСИГНАЛИЗАЦИЕЙ, В УСЛОВИЯХ  
МОДЕЛИ ОБРАТИМОЙ ИШЕМИИ МОЗГА  
КРЫС**

Ишемический инсульт является одним из наиболее частых заболеваний в России. Ишемия возникает как следствие критического снижения кровотока в тканях мозга, которое ведет к гибели нейронов и клеток глии, сопровождающейся массивным воспалением. Исключительное значение приобретает разработка новых стратегий нейропротекции и восстановления нервных тканей после ишемического инсульта. На сегодняшний день показано, что в ответе на патологическое воздействие участвуют не только информационные РНК, но и различные типы некодирующих РНК. Особый интерес представляют циклические РНК. Они зачастую образуются в белок-кодирующих генах в процессе бексплайсинга, при котором выявляется связь 3'-конца последующего экзона с 5'-концом предшествующего. Циклические РНК демонстрируют мозгоспецифический характер экспрессии, что может указывать на их особое значение в данной ткани, в качестве нейропротективных агентов или в качестве потенциальных биомаркеров для различных неврологических заболеваний. Наилучшим образом события, происходящие при ишемическом инсульте у человека, отражает модель обратимой ишемии мозга экспериментальных животных. В работе в условиях модели обратимой ишемии мозга крыс была исследована экспрессия генов *Grm3*, *Grm5*, *P1cb1* и *Gabra5* в подкорковых структурах мозга, содержащих очаг повреждения, через 3 и 22,5 ч. после реперфузии относительно групп ложнооперированных животных. Данные гены являются важными участниками метаболических путей, связанных с нейросигнализацией. Было показано, что все исследуемые гены помимо мРНК кодируют циклические РНК. С помощью ПЦР в реальном времени удалось выявить, что через 3 ч. после реперфузии уровень мРНК генов *P1cb1* и *Gabra5* был достоверно снижен в 2,6 раза, а через 22,5 часа изменения уровня мРНК данных генов не наблюдалось. В то же время, уровень циклических РНК генов *P1cb1* и *Gabra5* был стабильным во всех временных точках. Уровень мРНК генов глутаматных синапсов *Grm3* и *Grm5* был достоверно снижен более чем в 3 раза только через 22,5 ч. после реперфузии, в то время как уровень циклических РНК данных генов снижался менее значительно – в 1,5 раза. Результаты демонстрируют, что характер изменения уровня циклических РНК и мРНК исследуемых генов при ишемии различен. Уровень циклических

РНК преимущественно более стабилен, что может быть следствием устойчивости таких РНК в условиях ишемического повреждения. Мы предполагаем, что дальнейший анализ некодирующих РНК позволит приблизиться к пониманию механизмов генетических ответов клеток головного мозга на повреждение, вызванные ишемией, а также к более глубокому пониманию подходов к лечению этого заболевания.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (17-74-10189).*

**Фомичев А.В., Чернявский А.М.,  
Повещенко О.В., Карева Ю.Е., Минин С.М.,  
Никитин Н.А.**

ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.  
акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России  
a\_fomichev@list.ru

### **6-МЕСЯЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ИБС МЕТОДОМ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, ОБРАБОТАННЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОМ**

После проведения ряда крупных исследований эффекта применения мононуклеарной фракции костномозгового происхождения с целью ангио- и васкулогенеза, которые продемонстрировали неоднородные результаты, был начат поиск возможных вариантов повышения эффективности клеток костномозгового происхождения. Одним из направлений работы явилось использование различных факторов роста для обработки мононуклеарных клеток костного мозга. Множество экспериментальных работ посвящено использованию эритропоэтина для прекондиционирования мононуклеарных клеток костномозгового происхождения. Экспериментальные исследования на лабораторных животных показали, что применение эритропоэтина во время ишемии/реперфузии миокарда приводит к ограничению зоны инфаркта и степени апоптоза, способствует процессу неоангиогенеза.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Выполнена оценка полугодовых результатов имплантации прекондиционированных клеток костного мозга в лазерные каналы миокарда 21 пациента с несунтабельной правой коронарной артерией. В качестве контроля выбраны 22 человека с диффузным и дистальным поражением коронарного русла, которым не выполнялось шунтирование правой коронарной артерии. Так же при помощи проточной цитофлуориметрии выполнялась оценка функциональных свойств и фенотипа имплантируемых клеток.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В отдаленном послеоперационном периоде в основной группе было отмечено более значимое уменьшение стойких дефектов перфузии (с 8,98,1% до 3,84,9%) по сравнению с контрольной группой (с 6,44,7% до 3,53,5%) ( $p = 0.033$ ). Также выявлено статистически значимое уменьшение индекса нарушения перфузии миокарда ЛЖ после стресс-теста с 13,38,9 до 7,97,3. ( $p = 0.02$ ) У пациентов из группы контроля статистически значимого изменения не выявлено. Также в основной группе отмечается тенденция к улучшению функциональных показателей левого желудочка (КДО в основной группе уменьшился с  $114 \pm 38$  мл до  $83 \pm 34$  мл, ФВ ЛЖ увеличилась с  $55 \pm 17\%$  до  $61 \pm 25\%$ ; в кон-

трольной группе КДО — с  $117 \pm 29$  мл до  $91 \pm 45$  мл, ФВ ЛЖ — с  $54 \pm 13\%$  до  $58 \pm 28\%$ ). Методом проточной цитофлуориметрии показано, что обработка костномозговых клеток эритропоэтином способствует увеличению пула CD34+ клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки и созревания, задержке клеток в фазе покоя/начального роста, уменьшению количества клеток на ранней стадии апоптоза.

**ВЫВОДЫ.** Полученные данные подтверждают концепцию о том, что специальная подготовка аутологических клеток костного мозга посредством обработки эритропоэтином повышает функциональные свойства клеточного продукта, а разработанная технология улучшает перфузию и функцию миокарда в зоне воздействия. По мере набора материала и оценки годовых результатов будут сделаны окончательные выводы об эффективности использования аутологических клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином в хирургии ИБС.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект 16-15-00057).*

**Халиуллин М.Р.<sup>1</sup>, Журавлева М.Н.<sup>1</sup>,  
Масгутов Р.Ф.<sup>2</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>, Деев Р.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)  
Федеральный Университет»

<sup>2</sup> ГАУЗ «Республиканская клиническая больница»  
Минздрава Республики Татарстан

<sup>3</sup> Рязанский государственный медицинский  
университет им. акад. И.П. Павлова  
urkrass2@gmail.com

### **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ ПОТЕНЦИРУЕТ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТИ IN VIVO**

Костная ткань — одна из немногих тканей в человеческом организме, способная к полному восстановлению без образования соединительнотканых рубцов. Тем не менее, вероятность несращения кости в человеческой популяции колеблется в пределах 10–15%. Одним из подходов к лечению несращений является использование остеозамещающих материалов с целью усиления эффекта. Однако выяснилось, что время существования белков в месте имплантации недостаточно для оказания терапевтического эффекта. Нами была разработана двухкассетная экспрессионная плазмидная конструкция pBudKan-coVEGF165-coBMP2, несущая гены vegf165a и bmp2 под промоторами CMV и EF1- $\alpha$ . Ранее нами уже была показана эффективность работы плазмидной конструкции в условиях *in vitro* на культурах клеток. На основе описанной выше плазмидной конструкции и синтетических остеопластических материалов Колапол КП-3 (ООО «НПО «Полистом»), содержащего коллаген и гранулы гидроксиапатита, и октакальциевого фосфата (ОКФ) (ООО «БиоНова», Россия) создали ген-активированные костные графты (ГАКГ). Ген-активированные костные графты имплантировали ортотопически в искусственно сформированный дефект средней трети диафиза бедренной кости протяженностью 3 мм, в объеме, достаточном для заполнения дефекта (30 мм<sup>3</sup>) (масса ГАКГ КП-3  $5 \pm 1$  мг, содержание плДНК  $38 \pm 8$  мкг, масса ГАКГ ОКФ  $51.5 \pm 0.8$  мг, содержание плДНК  $160 \pm 2.5$  мкг). Костные отломки фиксировали на костном остеосинтезом с помощью металлической

пластины. По прошествии 30 и 60 сут. животных выводили из эксперимента и область вмешательства подвергали рентгенологическому и гистологическому исследованиям. Рентгенологическое исследование не выявило достоверных различий в суммарной интенсивности рентгеновской тени в контрольных и экспериментальных образцах, и показало наличие облаковидного затенения в области диастаза, свидетельствующее о формировании костной мозоли. Во всех случаях регенерация костной ткани происходила по вторичному типу, отклонений в процессах заживления кости не выявилось. После имплантации ГАКГ КП-3 на 30-е сут. суммарный объем хрящевой и костной ткани в составе костной мозоли выше, чем после имплантации ординарного КП-3 —  $45 \pm 4,2\%$  по сравнению с  $13,6 \pm 4,9\%$ . На 60-е сут. достоверной разницы в содержании костной ткани в мозолях с ординарными и ген-активированными костными графтами мы не наблюдали. Васкуляризация области дефекта через 30 сут. после имплантации ГАКГ КП-3 в 2,66 раза выше по сравнению с пустым дефектом, а на 60-е сут. — в 4,19 раза. Имплантация ординарных и ген-активированных костных графтов ОКФ не оказала стимулирующего влияния на васкуло- и остеогистогенез в области дефекта у использованной модели. Таким образом, ГАКГ на основе плазмидной конструкции pBudKан-coVEGF165-BMP2 и Колапола КР-3 способствует регенерации костной ткани и васкуляризации в модели травмы бедренной кости крысы.

Финансирование исследования: средства КФУ, гранты РФФИ, РФФ, ФЦП.

#### **Халявкин А.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Информатика и Управление» РАН  
antisenesc@mail.ru

#### **СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК – ПРИЧИНА ИЛИ СЛЕДСТВИЕ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА?**

У большинства организмов баланс убыль/восполнение клеток нарушается с возрастом, приводя к цитопении. Поэтому все больше сторонников находит гипотеза о ведущей роли первичного старения постнатальных внутритканевых стволовых клеток в возрастном замедлении обновления тканей и неполноте этого процесса. Последние полвека большинство цитогеронтологов вслед за Л. Хейфликом считают первичным именно старение клеток. Раз клетки не способны неограниченно долго существовать вне организма в идеальных, по мнению некоторых, условиях, то первопричина старения кроется именно в них, полагают цитогеронтологи и молекулярные генетики. А старение целостного организма есть неизбежное следствие старения составляющих его клеток. Поэтому последние полвека старение изучается в основном на клеточном и субклеточном уровне. Однако анализ накопленных данных показывает, что снижение и утрата пролиферативного потенциала культивируемых клеток, которые считаются одним из основных признаков старения, могут являться естественным следствием процесса терминальной дифференцировки, при котором запрограммировано блокируется способность клеток к размножению. В клеточных культурах непреднамеренно нарушается

естественное микроокружение стволовых соматических клеток, поддерживающее их на стадии стволовых и полустволовых (как базалоциты интерфолликулярного эпидермиса) клеток с неограниченным митотическим потенциалом. Это доказывается, как минимум, пятью способами: воссозданием клеточного микроокружения, устранением из внеклеточной среды дифференцировочных стимулов, добавлением к культуральной среде ингибиторов дифференцировки и блокированием последней конститутивной экспрессией протоонкогенов иммортализаторов или гена теломеразы. Во всех этих случаях, вопреки концепции Хейфлика, у нормальных диплоидных клеток не выявляется никаких признаков снижения потенциала размножения. Однако при переводе их в условия культивирования, разблокирующие выход в дифференцировку, пролиферативная активность клеток начинает снижаться, что всегда наблюдают многочисленные последователи Хейфлика. Исходя из вышеизложенного, истинное старение клеток следует считать вторичным и связанным с их жизнедеятельностью в условиях либо стареющего организма, либо неполноценной культуральной среды. Причем интересно, что такое старение оказывается во многом обратимым. Поэтому даже молекулярные биологи и цитогеронтологи стали обсуждать вопрос вынесения первопричины старения за пределы клеточной мембраны. Действительно, стволовые клетки, не ограниченные лимитом Хейфлика, управляются центральными механизмами регуляции. А они у стареющего организма, находятся вне зоны динамической устойчивости (Усп. геронтол. 1998 2 43; Биохимия 2014 79 1392). Это приводит к неадекватному уменьшению активности стволовых клеток и замедлению самообновления тканей, влекущему за собой возрастное снижение надежности организмов, повышению заболеваемости и смертности с возрастом. Но старение самих стволовых клеток оказалось обратимым и *in vitro* и *in vivo*.

Финансирование исследования: Бюджет.

#### **Харламова Н.В., Чаша Т.В., Шилова Н.А., Назаров С.Б., Попова И.Г.**

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России  
nataliakhar13@yandex.ru

#### **СОДЕРЖАНИЕ ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ С ПОСТГИПОКСИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ**

С целью определения содержания васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) в крови новорожденных с постгипоксическими нарушениями сердечно-сосудистой системы проведено обследование 207 детей. Основную группу наблюдения составили 90 доношенных новорожденных, находящихся на лечении в отделении реанимации новорожденных (ОРИТН) в критическом состоянии и имеющих постгипоксические нарушения сердечно-сосудистой системы (ПНССС), 100 новорожденных с ПНССС в стабильном состоянии, находящихся на лечении в отделении новорожденных акушерской клиники, контрольную группу составили 17 соматически здоровых доношенных новорожденных. Во время пребывания новорожденных в ОРИТН осуществлялась оценка агрессивности их лечения по шкале NTISS

(неонатальная шкала оценки агрессивности терапевтического вмешательства) (Gray J. E. et al., 1992). Для оценки эффективности лечения ПН ССС дополнительно было обследовано 68 новорожденных с этой патологией (все дети в раннем неонатальном периоде перенесли критическое состояние): 34 из них получали стандартную терапию, а 34 – в дополнение к ней – курс мягкого вибромассажа с моделированием невесомости с использованием кроватки «Сатурн-90». Определяли концентрацию VEGF в плазме крови методом иммуноферментного анализа с применением набора «Biosource» (Бельгия), результат выражался в пг/мл. Исследование показало значительные различия в уровне VEGF у новорожденных с ПН ССС и детьми контрольной группы. Таким образом, имеет место нарушение регенерации сосудов у новорожденных с ПН ССС. Содержание VEGF как одного из маркеров регенерации в плазме крови у этих детей было значимо ниже (в 1,8 раза), чем у кардиологически здоровых новорожденных ( $p < 0,01$ ). Низкий уровень VEGF свидетельствует о недостаточной интенсивности ангиогенеза и низком уровне защиты эндотелиоцитов. Наиболее выраженные изменения параметров регенерации эндотелия сосудов отмечены у новорожденных, получавших лечение в ОПИТН и терапию IV класса агрессивности: уровень VEGF был значительно ниже ( $42,12 \pm 8,52$ ,  $p < 0,02$ ). После пребывания в ОПИТН новорожденные были обследованы после проведения курса восстановительного лечения в отделении патологии новорожденных и недоношенных детей. Использование курса мягкого вибромассажа с моделированием невесомости с использованием кроватки «Сатурн-90» способствует увеличению VEGF, что свидетельствует о благоприятном влиянии указанного метода лечения на рост сосудов. Таким образом, изменения васкулоэндотелиального фактора роста у новорожденных с ПН ССС свидетельствуют об эн-

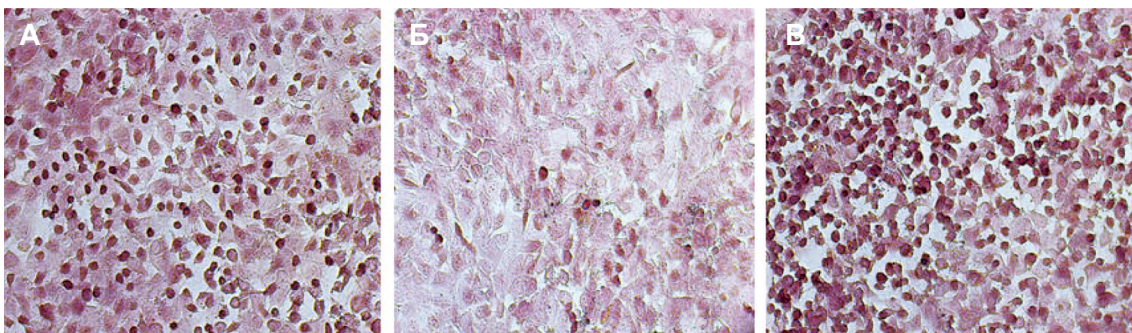
дотелиальной дисфункции и нарушении регенерации сосудов. Данный маркер может быть использован для оценки эффективности лечения детей с постгипоксическими нарушениями сердечно-сосудистой системы.

**Салихова Т.И., Хозяинова С.А., Сираева З.Ю.,  
Ергешов А.А., Абдуллин Т.И.**

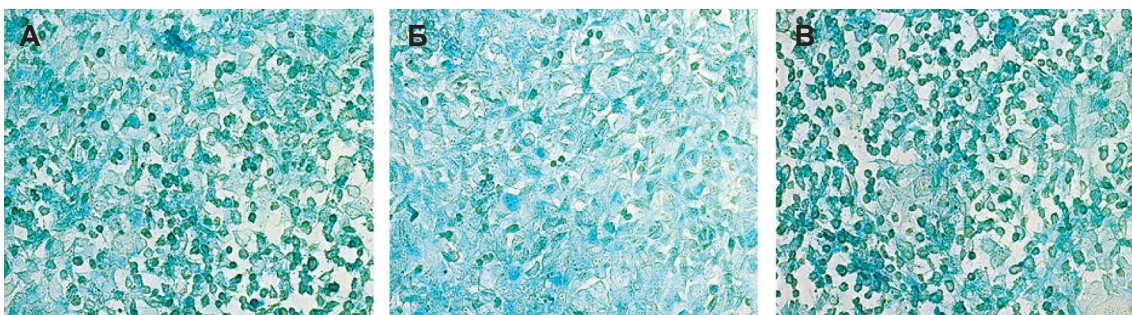
*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
svetik1895@list.ru*

#### **ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ЛИНИИ ATDC5 В ПРИСУТСТВИИ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ**

Перспективной *in vitro* моделью для изучения механизмов дифференцировки клеток в хондрогенном и остеогенном направлениях является клеточная линия тератокарциномы мыши ATDC5, которая в определенных условиях последовательно претерпевает стадии цитодифференцировки, характерные для хондроцитов и остеобластов [1]. В работе были подобраны и оптимизированы условия дифференцировки клеток ATDC5 и оценен эффект пептидных факторов на цитодифференцировку. Дифференцирующая среда DMEM/F12 содержала трансферрин, пируват натрия и аскорбиновую кислоту. Экспериментально подобрана концентрация аскорбиновой кислоты (20 мкг/мл), не ингибирующая рост клеток ATDC5. В качестве пептидных факторов дифференцировки исследованы рекомбинантный человеческий инсулин и препарат криптического пептида CP1, которые добавляли в среду через каждые 48 ч. Клетки фиксировали 4% раствором п-формальдегида, окрашивали ализариновым красным С (1%, pH 4,3) и альциановым синим (1%, pH 2,5) и регистрировали светлопольные оптические микрофотографии клеток. Дополнительно, живые клетки лизировали и детектировали в лизате уровень активности щелочной



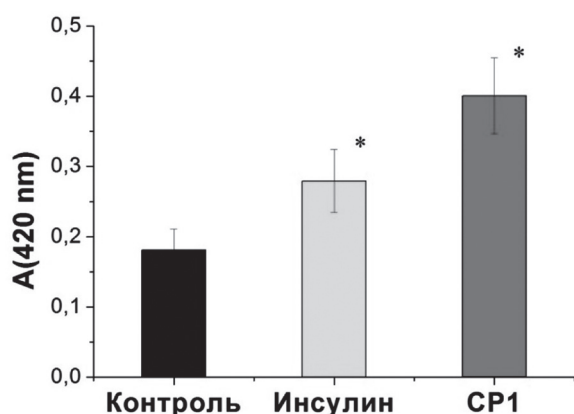
**Рис. 1.** Клетки ATDC5, окраска ализариновым красным: А – клетки, обработанные инсулином; Б – необработанные клетки; В – клетки, обработанные CP1 и инсулином



**Рис. 2.** Клетки ATDC5, окраска альциановым синим: А – клетки, обработанные инсулином; Б – необработанные клетки; В – клетки, обработанные CP1 и инсулином



фосфатазы (ЩФ) с использованием п-нитрофенола в качестве субстрата в ферментативной реакции. Установлено, что под действием инсулина большая часть первичной клеточной популяции приобретает фенотипические признаки, характерные для дифференцированных клеток (уменьшенные размеры, округлая форма). По сравнению с необработанными клетками более интенсивно окрашиваются ядро, ядрышки, элементы гранулярной ЭПС и аппарата Гольджи. В цитоплазме выявляется значительное количество секреторных вакуолей. Из полученного можно сделать вывод о том, что условия дифференцировки были подобраны правильно и оказывают благоприятное воздействие на клетки ATDC5. Обнаружено, что под действием препарата CP1 усиливаются процессы цитодифференцировки: увеличивается общее количество видоизмененных округлых клеток и интенсивность окраски красителями ализариновым синим и ализариновым красным. Полученные результаты были подтверждены количественным анализом микрофотографий, произведённым в программе ImageJ. В качестве маркера остеогенной дифференцировки определяли уровень фермента ЩФ в лизате клеток. Также установлено стимулирующее влияние препарата CP1 на процесс биосинтеза ЩФ клетками в количестве, в 2,27 раз превышающем контрольные значения. Таким образом, установлено, что препарат CP1 усиливает действие инсулина на дифференцировку клеток ATDC5. Полученные данные в совокупности свидетельствуют об индукции инсулином дифференцировки клеток в хондрогенном и остеогенном направлениях и активации синтезирующей активности клеток (синтез гликозаминогликанов и отложение кальцийсодержащих соединений в цитоплазме), типичной для более дифференцированных клеток. Препарат криптического пептида CP1 может быть использован в качестве индуктора процесса остеогенной дифференцировки клеток ATDC5.



**Рис. 3.** Уровень щелочной фосфатазы в лизате клеток ATDC5

#### Литература:

1. Tare, R. ATDC5: an Ideal Cell Line for Development of Tissue Engineering Strategies Aimed at Cartilage Generation [Text] / R. Tare, D. Howard, J. Pound, H. Roach, R. Oreffo // European Cells & Materials. – 2005. – Т.10, № 2. – Р. 22.

Финансирование исследования: 1. Государственная программа повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета (КФУ) среди ведущих мировых научно-образовательных центров, 2. Программа «УМНИК» Фонда содействия инновациям.

**Хорольская Ю.И.<sup>1</sup>, Александрова О.И.<sup>1</sup>, Юдинцева Н.М.<sup>1</sup>, Лобов И.Б.<sup>2</sup>, Игнатьева Е.В.<sup>2</sup>, Урусова М.Е.<sup>2</sup>, Блинова М.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России

juliya\_khorolskaya@mail.ru

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА DLL4-Fc НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Известно, что белок Dll4 (deltalike ligand 4) — лиганд для рецепторов Notch1 и Notch4, участвует в ангиогенезе. Dll4-Notch сигналинг является негативным регулятором VEGF-индуцированного ангиогенеза, нарушение этого ингибирования приводит к усилённому образованию кровеносных сосудов. Dll4-Fc — растворимый внеклеточный домен Dll4, соединённый с Fc фрагментом человеческого иммуноглобулина, который работает как анти-Dll4 препарат. Dll4-Fc связывается с рецептором Notch, предотвращая его взаимодействие с эндогенными Notch-лигандами и тем самым ингибирует Notch-сигналинг. Настоящая работа посвящена исследованию влияния рекомбинантного лиганда Dll4-Fc на функциональную активность эндотелиоцитов в различных условиях культивирования с целью возможного использования Dll4-Fc при разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), направленных на стимуляцию роста кровеносных сосудов в процессе репарации повреждённых органов и тканей. Для исследования ангиогенных свойств рекомбинантного лиганда Dll4-Fc в работе использовали тест-системы *in vitro* и *in vivo*. Исследование проводили на трёх линиях эндотелиальных клеток человека в условиях 2D и 3D культивирования, с использованием БМКП «Эквивалент дермальний ЭД». В данной работе нам не удалось получить данные, которые подтверждали бы позитивное влияние лиганда Dll4-Fc в исследуемых концентрациях на функциональную активность эндотелиальных клеток в условиях 2D культивирования. Однако нам удалось показать проангиогенный эффект рекомбинантного лиганда Dll4-Fc в условиях 3D культивирования эндотелиальных клеток человека *in vitro* и на *in vivo* модели ранозаживления с использованием БМКП «Эквивалент дермальний ЭД» в композиции с эндотелиальными клетками линии HUVEC. В условиях 3D культивирования на коллагеновом геле клеток линии ECV-304 лиганд Dll4-Fc позитивно влиял на состояние клеточной культуры. При изучении эффективности ранозаживления у крыс нанесение «Эквивалента дермального ЭД» в композиции с эндотелиоцитами линии HUVEC и рекомбинантным лигандом Dll4-Fc на раневую поверхность значительно усиливало ангиогенез на 5-е сут. после трансплантации. Таким образом, дальнейшие исследования в этой области могут способствовать разработке новых подходов к терапии различных повреждений тканей и органов.

Финансирование исследования: Поддержано проектом РФФИ № НК 15-29-04852\15 «Исследование влияния растворимого рекомбинантного белка Dll4-Fc (Delta-like ligand 4) в комплексе с культивируемыми эндотелиоцитами и дермальными фибробластами человека на васкуляризацию в процессе раневого заживления».

**Блинова М.И.<sup>1</sup>, Хотин М.Г.<sup>1</sup>,  
Никольский Н.Н.<sup>2</sup>, Михайлова Н.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Центр клеточных технологий Института цитологии РАН

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
h\_mg@mail.ru

**ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО  
БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
ПО СТАНДАРТУ GMP – ОТ ПОСТАНОВКИ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ЗАДАЧИ  
ДО СЕРИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА**

Разработки клеточных продуктов и технологий для регенеративной медицины проводятся в Институте цитологии РАН более 25 лет, начиная с фундаментальных исследований биологии клетки в культуре, до стадии НИОКР и применения технологий в клинике на основе полученных разрешений. К середине 2000-х годов была разработана линейка клеточных продуктов для восстановления поврежденной кожи, в том числе полный эквивалент кожи. На основе доклинических исследований с использованием животных моделей был определен продукт, обладающий наибольшей эффективностью для заживления ран – «Эквивалент дермальный» (ЭД). На клеточный продукт ЭД было получено регистрационное удостоверение, что позволило успешно применять его в клинической практике для лечения ожоговых больных и пациентов с трофическими язвами. На разной стадии НИР и НИОКР находятся разработки тканеинженерных клеточных продуктов и технологий для восстановления костной ткани, эндотелия, роговицы. Успешно прошли испытания клеточные продукты на основе скаффолдов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для регенерации стенок мочевого пузыря, свищей. Показано существенное ускорение заживления ран относительно консервативных методов лечения. Ведется разработка биомедицинского клеточного продукта на основе матрицы-носителя (коллаген и биоситал) и МСК человека для восстановления костной ткани. Исследования проводятся при взаимодействии с профильными медицинскими и научными учреждениями. Для создания биодеградируемых матриц разработаны методы выделения и очистки белков внеклеточного матрикса, создаются технологии получения плёнок на основе полилактида, фиброина шелка и хитозана, которые применяются при изготовлении тканеинженерных конструкций. Для организации трансфера разработок в 2017 г. открыт Центр клеточных технологий, создано и введено в строй опытное производство биомедицинских клеточных продуктов. Производственная зона представляет собой комплекс чистых помещений, оснащенных необходимым оборудованием. Внедрены изоляторные технологии для проведения асептических манипуляций. Ядром технологической цепочки является роботизированная станция для культивирования клеток CompactSelectT (TAPBiosystems), которая проводит в автоматическом режиме в асептических условиях весь клеточный процессинг. Созданная инфраструктура позволяет полностью стандартизировать процесс производства клеточных продуктов. Начиная с этапа проектирования внедрены принципы международного стандарта GMP (good manufacturing practice), при участии европейских экспертов успешно пройден аудит на соответствие проектным решениям этим правилам. В настоящее время проводится работа по отладке технологии

и внедрению систем обеспечения и контроля качества. К настоящему времени Институтом цитологии РАН проведен инновационный цикл – от фундаментальной разработки, НИОКР до опытного производства разработанных клеточных продуктов и внедрения технологии. Создана база для дальнейшего проведения доклинических и клинических исследований БМКП.

Финансирование исследования: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00068).

**Хотин М.Г.<sup>1</sup>, Александрова О.И.<sup>1</sup>,  
Хорольская Ю.И.<sup>1</sup>, Трашков А.П.<sup>2</sup>,  
Михайлова Н.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН»

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
h\_mg@mail.ru

**ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА  
«УНИФУЗОЛ» НА ОСНОВНЫЕ  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА  
ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ**

Представлены результаты исследования влияния лекарственного препарата УНИФУЗОЛ (производство ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») на функциональные свойства эндотелиоцитов человека в культуре. В работе исследовано влияние препарата на клеточную морфологию в двумерной и трехмерной системе культивирования, их пролиферативную активность, миграцию и тубулообразование. Эти клеточные процессы свидетельствуют о физиологическом состоянии клеток и могут быть использованы для оценки их функционального состояния. Исследование выполнено в соответствии с требованиями законодательства в отношении доклинических исследований лекарственных препаратов и стандарта GLP (good laboratory practice).

Влияние препарата исследовано с использованием клеточных линий эндотелиоцитов человека – ECV 304, HUVEC, GSE56 (HUVECs иммортализованная).

Пролиферация клеток оценивалась методом МТТ-теста. Влияние препарата на клеточную миграцию анализировали с использованием экспериментальной модели раны. Динамические характеристики этих процессов оценивали в реальном времени, используя клеточный анализатор xCELLigence (ACEA Biosciences), применение которого является наиболее информативным для таких исследований. Качественным показателем функционального состояния эндотелиоцитов в культуре, позволяющим оценить ангиогенную активность препарата, является спонтанное образование тубул – капилляроподобных структур. Исследовано действие препарата на модели эндотелиальной дисфункции *in vitro*.

Клетки культивировали в стандартных условиях. Препарат добавляли в культуральную среду в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мкл препарата на 1 мл культуральной среды. Для оценки действия препарата в контрольные пробы добавляли эквивалентные объемы фосфатно-солевого буфера.

Установлено, что лекарственный препарат УНИФУЗОЛ обладает выраженным эндотелиопротекторным эффектом при патологических состояниях эндотелиоцитов, вызванных разбавлением культуральной среды, изменением её ионного состава и на модели эндотелиальной дисфункции. Эффект проявлялся

в коррекции миграционной активности, жизнеспособности при патологических условиях и корректирующем действии на клеточную морфологию в модели эндотелиальной дисфункции. Препарат не оказывал влияния на морфологию и пролиферацию эндотелиоцитов в культуре и не влиял на тубулообразование клетками линий HUVEC и ECV-304.

Полученные результаты позволяют сделать выводы о наличии эндотелиопротекторного действия препарата УНИФУЗОЛ при патологии и отсутствии существенных эффектов в норме. Не получено данных о токсическом действии препарата УНИФУЗОЛ на основные клеточные процессы, характеризующие функциональное состояние эндотелиоцитов.

**Храмова Ю.В.<sup>1</sup>, Багаева Т.С.<sup>1</sup>, Никишин Д.А.<sup>1,2</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1,3</sup>, Семенова М.Л.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Биологический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>3</sup> ФГБНУ «НИИ Общей патологии  
и патофизиологии»

yul.khramova@gmail.com

#### **ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК СТРОМЫ ЯИЧНИКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ В 3D КУЛЬТУРЕ**

Проблемы сохранения фертильности человека остро стоят в современном обществе. При преодолении бесплодия для получения зрелых ооцитов пациенткам часто назначают гормоны, стимулирующие фолликулогенез. Однако гормональная стимуляция противопоказана при ряде заболеваний, в том числе онкологических. Для таких случаев существуют криобанки овариальной ткани с последующей трансплантацией ткани пациентке или культивированием *in vitro* и получением пригодных для оплодотворения яйцеклеток. Системы культивирования овариальных фолликулов с реконструкцией многокомпонентного микроокружения в настоящее время активно разрабатывают. Целью нашего исследования стало изучение эффективности сокультивирования первичных многослойных фолликулов с клетками стромы яичника в 3D культуре. Первичные культуры клеток стромы яичника человека получали из фрагментов криоконсервированной овариальной ткани и культивировали до 4 пассажа в стандартных 2D условиях (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 20 нг/мл bFGF (ProSpec, Израиль) инсулина-трансферрина-селенита и 10% фетальной телячьей сыворотки. Первичные многослойные фолликулы выделяли механическим путем из яичников половозрелых самок мышей линии BDF1 и культивировали индивидуально в 3D условиях в системе «висячая капля» в течение 7 сут. В опытной группе к каждому фолликулу добавляли по 3000 ксеногенных клеток стромы яичника человека, к контрольным фолликулам клетки не добавляли. Анализ экспрессии маркеров функционального состояния фолликулов проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифичных праймеров. При культивировании в 3D системе структура фолликулов сохранялась, их размеры увеличивались, как в опытной, так и в контрольной группах. В опытной группе клетки и фолликулы формировали единую структуру, в которой ксеногенные клетки

занимали поверхностное положение. Через 7 сут. в опытной группе, в сравнении с контрольной, возрос уровень экспрессии мРНК генов ферментов синтеза эстрогенов (CYP19A1) и андрогенов (CYP17A1), рецепторов фолликулостимулирующего (FSHR) и лютеинизирующего (LHR) гормонов. Значимые различия выявлены только в экспрессии генов мыши, но не человека. То есть, сокультивирование овариальных фолликулов мыши с клетками первичной культуры стромы яичника человека приводило к активации процессов стероидогенеза в самом фолликуле, но не в добавленных клетках. Вероятно, добавление стромальных клеток к овариальным фолликулам стимулировало в них экспрессию функционально значимых для нормального роста и развития генов. Таким образом, сокультивирование в 3D условиях овариальных фолликулов с соматическими клетками может стать модельной системой для изучения регуляции и морфогенеза в растущем фолликуле и открывает новые подходы повышения эффективности фолликулогенеза *in vitro* для получения компетентных к оплодотворению яйцеклеток.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).*

**Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В.,  
Арташян О.С.**

Институт иммунологии и физиологии  
Уральского отделения РАН  
hramtsova15@mail.ru

#### **РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕМЕННИКОВ**

Бесплодие у мужчин — важная медицинская и серьезная социальная проблема. Яичко — иммунопривилегированный орган, и на пути к достижению полноценного восстановления его структуры и функций после повреждения лежит пока непреодолимый барьер — аутоиммунные процессы, развивающиеся в ответ на любую травму. Иммунная система играет важную роль в физиологической регенерации семенников, обеспечивая иммунный гомеостаз в яичках. Неотъемлемым компонентом их иммунного микроокружения являются тучные клетки (ТК), которые участвуют в поддержании иммунной привилегии яичек. Вместе с тем, выявляется отчетливая отрицательная корреляция между числом ТК и состоянием сперматогенеза. Поиск возможных путей повышения эффективности регенерации семенников является одной из важнейших проблем репродуктивной физиологии. Цель работы: исследовать роль ТК в репаративной регенерации семенников. Исследование проводили на 40 половозрелых крысах самцах линии Вистар, которых разделили на 4 группы: 1) интактные крысы; 2) крысы, которым наносили острую травму, прокалывая левый семенник иглой диаметром 3 мм; 3) крысы, которым наносили тупую травму, сдавливая левый семенник пинцетом; 4) крысы с экспериментальной моделью варикоцеле. Через 7 и 30 сут. после повреждения оценивали состояние сперматогенеза и измеряли ряд показателей, свидетельствующих о ходе репаративной регенерации. Подсчет ТК проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм<sup>2</sup>. Типировали ТК с последующим расчетом показателей среднего гистохимического коэффициента и индекса де-

грануляции, свидетельствующих о синтетической и функциональной активности ТК. Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна — Уитни. При острой травме повышается синтетическая и функциональная активность ТК при их неизменном количестве в поврежденном органе. При этом в семенниках отмечаются интенсивно развивающиеся деструктивные процессы. К 30-м сут. после прокола наблюдается ухудшение картины. Тупая травма семенника приводит к еще большему изменению со стороны ТК в яичках. На 7 сут. после повреждения наблюдается повышение их количества в семеннике, растет синтетическая и функциональная активность. На 30 сут. отмечается снижение количества и синтетической активности ТК, однако функциональная активность остается на высоком уровне. При этом в поврежденном семеннике после тупой травмы развиваются деструктивные процессы. Через 7 сут. после развития варикоцеле у крыс на фоне отсутствия количественных изменений ТК в семенниках наблюдается повышение их синтетической и функциональной активности. Через 30 сут. отмечается резкое снижение и количества ТК, и их активности. Эти данные противоречат литературным. Возможно, эти различия связаны с разными сроками и объектами исследования, а также окраской на ТК. Таким образом, характер травмы влияет не только на ход репаративной регенерации семенников, но и на морфофункциональные показатели ТК. Распределение и функциональная активность ТК сильно варьируют в зависимости от типа повреждения, и выявить однотипной реакции тучных клеток на травму семенников не удалось.

**Хрупа Д.А.<sup>1,2</sup>, Хрупа А.И.<sup>1</sup>,  
Мальчевский В.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Тюменский Научный Центр СО РАН

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Тюменский Государственный медицинский университет»  
d.a.khrupa@mail.ru

#### **К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНЫХ ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО КОКСАРТРОЗА**

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить в эксперименте влияние цитотерапии на посттравматическую репарацию гиалинового хряща тазобедренного сустава.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Материалом для исследования послужили наблюдения за 90 лабораторными кроликами Калифорнийской породы женского пола с смоделированным посттравматическим коксартрозом I рентгенологической стадии с преимущественной III–IV степенью хондромалиции (ХМ) суставного хряща, разделёнными на три равные группы по 30 особей в каждой. Моделирование посттравматического коксартроза осуществлялось под артроскопическим контролем путем забора хряща пункционной иглой диаметром 2 мм до субхондральной кости из нагружаемой части головки бедра. Забор хряща равнялся 2 мм. В I группе после моделирования коксартроза лечение не проводилось, во II — лечебные мероприятия состояли из артроскопии и медикаментозного лечения, а в III — вместо медикаментозной терапии применялась регенерационная цитотерапия. В качестве факторов роста в регенерационной цитотерапии использовались фетальные стволовые клетки. Они вводились внутрисуставно пункционно

на 3 сут. после завершения артроскопии однократно в количестве 500 000 единиц, в качестве среды для введения использовалось 0,5 мл изотонического 0,9% раствора NaCl<sub>2</sub>. Результаты исследования и их обсуждение. Гистологическое исследование суставного хряща тазобедренного сустава у животных проводилось после выведения кроликов из эксперимента через 6 мес. от начала лечения. В I группе при гистологическом исследовании было выявлено частичное замещение области дефекта фиброзной тканью, полное нарушение цитоархитектоники в поверхностной и глубокой слоях прилежащих зон хряща, с нарушением линии «волнистой границы», выраженные явления деструкции, отсутствие пролиферации клеток. Во II группе при гистологическом исследовании было выявлено частичное замещение области дефекта фиброзной тканью, с частичным нарушением цитоархитектоники в поверхностной и глубокой слоях прилежащих зон хряща, с незначительными нарушениями линии «волнистой границы», явления деструкции, слабая пролиферация клеток. В III группе при гистологическом исследовании было выявлено полное замещение области дефекта гиалиноподобной тканью, восстановление цитоархитектоники в поверхностной и глубокой слоях прилежащих и зонах повреждения хряща, без нарушения линии «волнистой границы», отсутствие явлений деструкции, активная пролиферация клеток. При применении цитотерапии у кроликов не было выявлено никаких нежелательных побочных эффектов. Вывод: Применение в эксперименте цитотерапии при лечении коксартроза эффективно стимулирует посттравматическую репарацию гиалинового хряща головки бедра, позволяет остановить нарастание в нём патологических изменений, что открывает широкие перспективы для использования клеточных технологий в реабилитации больных с данной патологией.

**Финансирование исследования:** *Спонсорская помощь не использовалась при выполнении представляемой научной работы. В определении структуры исследования, сборе, анализе и интерпретации данных, а также принятии решения о публикации полученных результатов спонсоры и другие сторонние организации участия не принимали.*

**Цыбденова А.П.<sup>1</sup>, Иванова Ю.В.<sup>1</sup>,  
Алексеева Э.А.<sup>1</sup>, Коллекер А.Л.<sup>1</sup>,  
Хангажинов А.А.<sup>2</sup>, Хитрихеев В.Е.<sup>1</sup>,  
Дашинмаев Э.Б.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет»

<sup>2</sup> Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

<sup>3</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
8727127@mail.ru

#### **ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛАГЕН-ЛАМИНИНОВЫХ МАТРИЦ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ТКАНЕГЕНЕЗА**

С помощью тканеинженерных подходов и сочетания методик экстрагирования коллагена, создания коллагеновых матриц, культивирования импортированных кератиноцитов кожи линии HaCaT на коллагеновой подложке с последующей фиксацией и децеллюлированием детергентами создана белковая композиция, состоящая из двух основных компонентов — коллагена и ламинина базальной мембраны, находящихся в полном гистотипическом

подобии со строением кожи человека. Первый блок исследований, выполненный нашим коллективом, включает в себя: — отработку протокола выделения раствора коллагена I типа, подбор условий полимеризации раствора коллагена в гелевую матрицу; — оптимизацию условий культивирования иммортализованных кератиноцитов кожи человека линии HaCaT на коллагеновых матрицах; — децеллюлирование трехмерной коллаген-ламининовой матрицы с получением готового продукта для ранозаживления. В ходе второго блока исследований с помощью гистологических и иммуногистохимических методов была проведена идентификация матричных компонентов и оценка эффективности ранозаживления *in vivo* на моделях раневого дефекта кожного покрова у лабораторных животных (крысы-самцы линии Вистар). Полученные данные по восстановлению целостности кожного покрова свидетельствуют о том, что созданная репаративная композиция обладает высокой эффективностью ранозаживления благодаря направленному росту регенерирующей ткани с поддержанием процессов васкуляризации. Полученный биосовместимый ранозаживляющий материал, основанный на комбинации полимерной подложки и продукта синтеза кератиноцитов человека, при этом лишенный клеточной составляющей, отличается сравнительной простотой изготовления, длительностью срока хранения, что позволяет рекомендовать конструкцию к внедрению.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ № 16-44-030854.*

**Чапленко А.А., Мельникова Е.В.,  
Меркулова О.В., Меркулов В.А.**

*ФГБУ «Научный центр экспертизы средств  
медицинского применения» Минздрава России  
a.a.chaplenko@yandex.ru*

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Бактериальный эндотоксин (БЭ) — структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, состоящий из блока О-антигена, олигосахарида сердцевинки и липида А. Наряду с пирогенной активностью, эндотоксин также повышает проницаемость клеточной мембраны. При парентеральном введении эндотоксин может вызывать следующие токсические эффекты — диарею, септический шок, активацию системы комплемента, некроз. Таким образом, анализ всех средств медицинского применения, вводимых парентерально, на содержание БЭ, является важным тестом готового продукта, который должен быть обязательно включен в нормативную документацию. Максимальный уровень содержания эндотоксинов, допустимый FDA, составляет 5,0 единиц эндотоксина (ЕЭ)/ кг массы пациента/ дозу, вводимую в течение часа. В настоящее время используются 2 основных типа методов определения БЭ — тест пирогенности на кроликах и LAL-тест, в котором используется лизат амебоцитов мечехвоста. Когда LAL-тест был предложен впервые (в 70-е годы прошлого века), существовал всего один его вариант — гель-тромб метод. В настоящее время к нему добавились кинетические методы анализа (турбидиметрический и хромогенный), отличающиеся большей

экспрессностью и меньшей трудоемкостью анализа. В связи с высокой чувствительностью LAL-теста, для его проведения необходимо использовать только специально очищенные от БЭ воду и реактивы, а также соблюдать в работе крайнюю осторожность. Нарушение методики проведения, а также повтор испытания могут задержать выпуск и введение препарата на 4 и более часов, что может сказаться на качестве продукта, а так же на самочувствии пациента. Особенно важно время проведения анализа и его надежность для продуктов с очень ограниченным сроком годности, к которым относятся биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — продукты, содержащие живые клеточные линии человека. Таким образом, весьма актуальной является адаптация автоматизированных систем проведения ЛАП-теста для целей контроля качества БМКП — это позволит максимально ускорить процедуру анализа и значительно сократить влияние человеческого фактора. Для исследования на содержание эндотоксинов лабораторией клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова были любезно предоставлены образцы клеточных линий человека (фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ), МСК эндометрия) и питательных сред, в которых происходило культивирование клеток. Образцы биоматериала для выделения клеток были предоставлены донорами без хронических заболеваний в возрасте от 20 до 65 лет. Всего было проанализировано 18 клеточных линий от 18 доноров — 8 МСК ЖТ, 5 фибробластов и 5 МСК эндометрия. Рабочее разведение — 1:20. Для анализа была выбрана автоматизированная система EndosafePTS со средним временем анализа менее 15 мин. (в отличие от нескольких часов с использованием традиционных методов). В качестве метода сравнения использовали гель-тромб тест. Результаты анализа показали хорошую сходимость для классической и исследуемой методики. Анализ с использованием автоматизированной системы дает правильные и воспроизводимые результаты. Таким образом, система EndosafePTS может быть рекомендована для контроля качества биомедицинских клеточных продуктов.

**Масгутов Р.Ф.<sup>1,2</sup>, Чекунов М.А.<sup>1</sup>,  
Салихов Р.З.<sup>1</sup>, Теплов О.В.<sup>1</sup>, Плаксейчук Ю.А.<sup>1</sup>,  
Галимов Д.Х.<sup>1</sup>, Теплова Ю.С.<sup>1</sup>, Масгутова Г.А.<sup>2</sup>,  
Журавлева М.Н.<sup>2</sup>, Ризванов А.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ГАУЗ «Республиканская клиническая больница»  
Минздрава Республики Татарстан

<sup>2</sup> ФГАУ ВПО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет»  
mischania2011@bk.ru

#### **КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРЯМОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗАМЕДЛЕННОЙ КОНСОЛИДАЦИИ ПЕРЕЛОМОВ И ПСЕВДОАРТРОЗАХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ У ЧЕЛОВЕКА**

По литературным данным, частота неудовлетворительных исходов в виде замедленной консолидации и псевдоартрозов трубчатых костей человека варьируется в широком диапазоне и составляет от 0,5 до 30%. Для пациентов с замедленной консолидацией и псевдоартрозами трубчатых костей, у которых длительное время наблюдалось отсутствие

достоверных положительных результатов после применения неоднократных оперативных пособий, нами была применена прямая генная терапия. Клинический материал охватил период с 2015 по 2017 г. Мы применили прямую генную терапию двумя терапевтическими генами в составе мультицистронной плазмиды pBUB-VEGF165-BMP2 у 25 пациентов. Восстановление костной регенерации и перестройка в послеоперационном периоде оценивалась при визуальном осмотре пациента, по интенсивности болевого синдрома на визуально-аналоговой шкале, по опороспособности нижней конечности, по результатам рентгенологического исследования, а также по рентген-компьютерной томографии на сроках 3 мес., 6 мес., 12 мес. и результатам наблюдения в отдаленном периоде. После оперативного лечения с применением генной терапии у пациентов на сроке от 3 до 6 мес. на контрольных рентгенограммах определялись признаки консолидации, отмечалась положительная клиническая картина – восстановление опороспособности конечности, уменьшение болевого синдрома до его полного купирования. Таким образом, результаты клинического исследования свидетельствуют о том, что функция конечности значимо улучшилась на сроке от 3 мес. до 1 года после применения генной либо клеточной терапии. Улучшение функционального состояния конечности выражалось в снижении болевого синдрома и улучшения опорной функции.

Финансирование исследования: 1. ГАУЗ «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань. 2. ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

**Балашов В.А.<sup>1</sup>, Докучаева А.А.<sup>2</sup>,  
Коробейников А.А.<sup>2</sup>, Лепендин С.О.<sup>2</sup>,  
Павлова С.В.<sup>3</sup>, Слотвицкий М.М.<sup>1</sup>,  
Стрельников А.Г.<sup>2</sup>, Цвеляя В.А.<sup>1</sup>,  
Чепелева Е.В.<sup>2</sup>, Сергеевичев Д.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН  
e\_chepeleva@meshalkin.ru

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ  
СОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ  
НАНОВОЛОКОННЫХ МАТРИКСОВ,  
ЗАСЕЛЕННЫХ КАРДИАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ  
КУЛЬТУРОЙ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ  
НА МИНИ-СВИНЯХ**

На сегодняшний день использование синтетических биodeградируемых полимеров на основе полиуретана, поликапролактона, полилактатной кислоты (PLA), полигликолевой кислоты (PGA) и их сополимеров является наиболее перспективным направлением в тканевой инженерии. Оптимальным методом для создания нановолокон с различными механическими и биофизическими свойствами является электроспиннинг. Указанная технология позволяет создать надежный матрикс, способный к биodeградации и обладающий хорошей биосовместимостью. Данная работа посвящена изучению полимерных нановолокон, используемых в качестве носителя для клеток,

применяющихся в терапии сердечно-сосудистых заболеваний с целью замещения функции проводящей системы сердца. Полимерные нановолоконные матриксы производились при помощи установки электроспиннинга. Диапазон диаметров полимерных волокон составлял от 300 нм до 2000 нм. Длина волокон: от 3 мм до 20 мм. Пространственная плотность: от 5 до 1000 волокон на миллиметр. Степень параллельности для образцов с параллелизацией нановолокна:  $\pm 15-17^\circ$ . Полученные матриксы заселялись культурами клеток, полученными из предсердий мини-свиней методом механического измельчения и ферментативного гидролиза. Для маркирования кардиоваскулярной клеточной культуры конститутивной экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP) использовали плазмиду pGprg, несущую ген GFP под контролем промотора CMV. В эксперименте исследовали 2 группы животных по 3 мини-свиньи в каждой: первой группе в ходе экспериментальной операции имплантировали образцы матриксов, заселенные кардиальной клеточной культурой (в количестве 100 000 клеток на один матрикс диаметром 9 мм), второй группе – незаселенные матриксы. Доступ в грудную клетку осуществлялся парастернально, разрезались поверхностные и глубокие мышцы и фасции, обнажали сердце и убирали перикард. На верхушке сердца был сделан продольный разрез глубиной около 5 мм, внутрь помещали матрикс, затем разрез ушивали лигатурой диаметра 6.0. На грудные мышцы и кожу накладывали швы лигатурой диаметра 2.0. Через 7 дней после операции животные выводили из эксперимента и забирали участки миокарда с имплантированными матриксами. Оценка жизнеспособности трансплантированной клеточной культуры производилась с помощью ХТТ-теста. Состояние миокарда подопытного животного оценивалось с помощью стандартного гистологического исследования, а также иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов сердца для выявления развития воспаления в зоне имплантации. По предварительным данным, через 7 дней после имплантации определялось  $40 \pm 10\%$  клеток относительно исходного количества. Это свидетельствует о хорошей приживляемости трансплантированных клеток. Полученные результаты могут способствовать развитию разработки полимерных носителей для изучения биофизических и электрофизиологических свойств культивированных тканей сердца, что позволит расширить возможности регенеративной медицины и может стать стандартом развития аутологичной биологической терапии.

Финансирование исследования: Проект РФФ 16-15-10322 «Разработка научных подходов создания пейсмейкерных клеток человека с целью замещения функции проводящей системы сердца, используя матрицы из полимерного нановолокна».

**Чермных Э.С.<sup>1,2</sup>, Киселева Е.В.<sup>1,2</sup>,  
Роговая О.С.<sup>1,2</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова» РАН

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский  
медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
elinachermnykh@mail.ru

### **ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ УСКОРЯЕТ РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ В МОДЕЛИ ПОЛНОСЛОЙНОЙ РАНЫ МЫШИ**

Несмотря на последние достижения в области биоинженерии, заживление ран остается серьезной клинической проблемой. Для полноценного замещения поврежденных дермы и эпидермиса целесообразно использование тканеинженерных конструкций, состоящих из дермального и эпидермального компонентов. Чтобы временно компенсировать дефицит соединительной ткани в ране и заполнить эпителиальный дефект, мы использовали различные матрицы, отличающиеся наличием клеток и пористостью. Мы изучили влияние тканеинженерного живого эквивалента кожи (ЖЭК), представляющего собой коллагеновый матрикс, заселенный клетками кожи. Для сравнения регенерационной способности ЖЭК использовали бесклеточный коллагеновый матрикс и пористую желатиновую губку. Исследования проводили на 6 недельных самцах мышей линии C57Bl/6 в модели шинированной полнослойной кожной раны. Заживление раны исследовали на 6 и 13 сут.: иммуноцитохимическим методом оценивали количество пролиферирующих клеток в эпителии и дерме, количество сосудов, клеток воспаления, волосных фолликулов. В нашем исследовании показано стимулирующее действие ЖЭК на васкуляризацию раны, пролиферацию клеток, как в эпителии, так и в дерме, что приводит к ускорению регенерации полнослойной кожной раны.

Финансирование исследования: *Работа была проведена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН 0108-2016-0005.*

**Чернова О.Н.<sup>1</sup>, Мавликеев М.О.<sup>1</sup>,  
Яковлев И.А.<sup>1</sup>, Соловьева В.В.<sup>1</sup>,  
Старостина И.Г.<sup>1</sup>, Титова А.А.<sup>1</sup>,  
Зейналова А.К.<sup>1</sup>, Калигин М.С.<sup>1</sup>,  
Ризванов А.А.<sup>1</sup>, Киясов А.П.<sup>1</sup>, Деев Р.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

<sup>2</sup> Институт стволовых клеток человека  
olgachernova92@yandex.ru

### **ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ BLA/J ПОСЛЕ ТРАНСДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ АДЕНОВИРУСОМ AD5-DYSF**

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из белков, участвующих в процессах регенерации мышечных волокон (МВ), является дисферлин, кодируемый геном DYSF. Мутации в гене приводят к неспособности МВ адекватно реагировать на повреждение сарколеммы, что в дальнейшем приводит в атрофии и некрозу мышц. У человека снижение или отсутствие экспрессии DYSF приводит к развитию поясно-конечностных мышечных дистрофий 2В, также именуемых дисферлинопатии. Данная группа заболеваний сопровождается прогрессирующей слабостью и атрофией мышц

с раннего возраста. С целью изучения процессов, протекающих при дисферлинопатиях, существует несколько десятков линий мышей, несущих мутацию в DYSF, одной из которых является Bla/J.

**ЦЕЛЬ.** Оценка влияния рекомбинантного аденовируса Ad5-Dysf на состояние скелетных мышц у мышей, несущих мутацию в гене DYSF.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Мыши линии Bla/J репродуктивно произведена инъекция 100 мкл  $6,5 \times 10^8$  БОЕ рекомбинантного аденовируса Ad5-Dysf. На 30 сут. после трансдукции был произведен забор мышц голени. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, проводили иммуногистохимический анализ с антителами к  $\alpha$ -SMA, Ki67 и myogenin. В качестве контроля выступала мышь Bla/J того же возраста.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Средняя площадь поперечного сечения мышечных волокон (МВ) в мышце экспериментальной группы была выше ( $747,5 \pm 408,6 \mu\text{m}^2$  и  $515,3 \pm 300,8 \mu\text{m}^2$  у контроля,  $p = 0,000002$ ), что отражает вызванную трансдукцией гипертрофию МВ. Содержание некротизированных мышечных волокон в экспериментальной группе было несколько выше ( $14,4 \pm 4,0\%$  и  $11,6 \pm 2,9\%$ ,  $p = 0,04$ ), так же, как и доля центральоядерных МВ ( $21,2 \pm 7,0\%$  и  $18,9 \pm 5,6\%$ , соответственно). Доля Ki-67-позитивных ядер в интерстиции была больше после трансдукции Ad5-Dysf ( $35,1 \pm 17,2\%$  и  $8,57 \pm 18,3\%$ ,  $p = 0,0001$ ), в то время как содержание соединительной ткани было ниже ( $18,1 \pm 4,9\%$  и  $25,7 \pm 7,1\%$ ,  $p = 0,04$ ), что свидетельствует о меньшем замещении соединительной тканью мышцы у экспериментальной мыши. Отношение числа сосудов к числу МВ у обоих животных было примерно равным ( $0,23 \pm 0,03$  и  $0,23 \pm 0,06$  у контроля). Процент миогенин-позитивных ядер был выше после введения Ad5-Dysf ( $28,3 \pm 6,5\%$  и  $15,8 \pm 5,7\%$ ,  $p = 0,000031$ ), а Ki-67-позитивных ядер, наоборот, ниже ( $20,0 \pm 5,2\%$  и  $27,5 \pm 6,7\%$ ,  $p = 0,013$ ), что позволяет сделать вывод о большей степени дифференцировки и более завершеном рабдомиогенезе после инъекции.

**ВЫВОД.** Предварительные данные показывают, что системное введение Ad5-Dysf усиливает активность рабдомиогенеза *in vivo* и может быть использовано в качестве потенциальной генной терапии дисферлинопатий. Для более достоверных результатов планируется продолжение эксперимента с введением в него большего числа линейных животных, а также с мышами линии C57Bl/6.

Финансирование исследования: *Институт стволовых клеток человека.*

**Черносова В.С.<sup>1,2</sup>, Степанова А.О.<sup>1,2</sup>,  
Кузнецов К.А.<sup>2</sup>, Квон Р.И.<sup>3</sup>, Карпенко А.А.<sup>2</sup>,  
Лактионов П.П.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им.

акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

<sup>3</sup> Институт катализа им. Г.К. Борескова  
vera\_mal@niboch.nsc.ru

### **ДОСТАВКА БЕЛКОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКОНА ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА**

Управление доставкой биополимеров и низкомолекулярных лекарственных препаратов из 3Д скэфолдов является актуальной задачей тканевой инженерии, поскольку позволяет оптимизировать взаимодействие имплантируемых изделий с окружающими клетками и тканями. В представленной работе мы исследовали распределение и высвобождение человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и паклитакселя (ПТ) в/из волокон 3Д матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из смесей поликапролактона (ПКЛ) с ЧСА, ПКЛ с ПТ, ПКЛ с ЧСА и ПТ. Исследуемые 3Д матриксы получали из растворов компонентов в гексафтор-2-пропаноле. Для исследования высвобождения ПТ из матриксов был использован радиоактивно меченый ПТ, полученный методом обмена термоактивированного трития (Патент № 1823961 АЗ), с последующим определением высвобожденной радиоактивности при помощи сцинтиллятора. Концентрацию альбумина, высвобожденного из состава матриксов, исследовали при помощи иммуноферментного анализа. Для исследования состава поверхности матриксов использовали метод фотоэлектронной рентгеновской спектроскопии (РФЭС). При помощи РФЭС было обнаружено, что поверхностный слой матриксов обогащен как белком, так и паклитакселем. Показано, что концентрация белка в поверхностном слое матрикса в 2–12 раз выше, чем в исходном растворе: чем ниже концентрация белка в растворе, тем выше его относительное содержание на поверхности матрикса. Из состава матриксов высвобождается не более 10% от введенного белка, причем количество высвобожденного ЧСА пропорционально его концентрации в растворе для электроспиннинга. В матриксах, изготовленных из ПКЛ с ПТ, по данным РФЭС концентрация ПТ в поверхностном слое в 1000 раз выше по сравнению с его концентрацией в волокне, 50% от введенного ПТ высвобождается впервые сутки, причем высвобождение в сыворотку крови происходит быстрее, чем в физраствор. Высвобождение ПТ из матриксов с ЧСА зависит от его перераспределения между ЧСА, связанным с поверхностью волокна и ЧСА (или белками сыворотки) в растворе. Однако в матриксах, содержащих ПКЛ с добавлением ЧСА и ПТ, паклитаксель так же преимущественно локализован на поверхности и быстро покидает волокна. Показано, что введение в раствор для электроспиннинга низкокипящих растворителей позволяет уменьшить концентрацию ПТ на поверхности и уменьшить скорость его высвобождения из волокон. При этом высвобождение ПТ описывается двухфазной кривой: в физраствор 20% ПТ высво-

бождается в течение 9 ч., а фаза медленного высвобождения ПТ занимает не менее 20 дней; в сыворотку 45% ПТ высвобождается в течение первых 3 ч., а фаза медленного высвобождения ПТ занимает не менее 20 дней. Это позволяет длительно поддерживать цитотоксическую концентрацию ПТ в ткани и использовать такие матриксы в качестве покрытий металлических стентов, противоспаечных мембран, т.е. в случаях, когда требуется предотвратить рост тканей (неоинтимы, соединительной ткани) в месте установки медицинского изделия.

**Черноруцкий М.В., Костюк Н.В.**

ФГБОУ ВО «Тверской государственный  
медицинский университет» Минздрава России  
michail1911@mail.ru

### **ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВТОРНОЙ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ АДИПОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

Благодаря сочетанию высокой пролиферативной активности и способности к мультилинейной дифференцировке дедифференцированные жировые клетки (ДЖК) рассматриваются в качестве нового источника клеточного материала для регенеративной медицины. Пластичность адипоцитов также делает их ценным объектом для изучения механизмов клеточной дедифференцировки, редифференцировки и трансдифференцировки. Показано, что, в отличие от мезенхимных стромальных клеток (МСК), ДЖК сохраняют способность к редифференцировке даже в длительных культурах. При этом нет экспериментальных доказательств возможности многократного прохождения адипоцитами циклов де-/редифференцировки. Изучению этого вопроса было посвящено данное исследование. Первичные адипоциты, выделенные из подкожного жира крыс, подвергали многоступенчатой очистке и поддерживали в «питательной» культуре в обедненной среде (DMEM / F12 + 10% FBS с антибиотиком). За состоянием клеточной популяции следили с помощью микроскопов с прямой и инвертированными оптическими схемами, содержание липидов качественно и количественно оценивали после окраски OilRedO. В ходе дедифференцировки одиночные жировые клетки последовательно проходили стадии прикрепления, распластывания и активной пролиферации, сопровождающейся потерей липидных включений. К третьей неделе формировался конфлюэнтный монослой из потомков дедифференцированных адипоцитов. При последующем пассировании ДЖК переводили в обычную монослойную культуру. В полной питательной среде (DMEM + 10% FBS) 60-70% клеток вступало на путь спонтанной редифференцировки, которая характеризовалась ростом жировых капель, изменением клеточной формы с фибробластоподобной на сферическую, отрывом зрелых адипоцитов от поверхности культурального пластика. При этом скорость редифференцировки превышала скорость типичной адипогенной дифференцировки МСК. Всплывающие адипоциты улавливали с помощью покровных стекол и вновь переводили на обедненную питательную среду. В этих условиях фиксировались морфологические изменения, описанные выше. Повторная дифференцировка оказалась вдвое эффективнее однократной. Таким образом удалось проделать 3 последовательных цикла де-/редифференцировки первичных адипоцитов. Примечательно,



что аналогичным образом вели себя и адипоциты, индуцированные из МСК. Полученные результаты доказывают, что в культуре *in vitro* возможно многократное изменение дифференцировочного статуса адипоцитов. При этом факторами определяющими направление сдвига (де- или редифференцировка) являются трофический, гипоксический и, вероятно, контактный. Представляется, что способность жировых клеток к многократной де-/редифференцировке может иметь важное значение для физиологической и репаративной регенерации в целом организме, где адипоциты наряду с МСК служат клеточным материалом для восстановительных процессов.

#### **Чернявская Е.А.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины*

*elena\_chernyavskaya@ukr.net*

#### **СТРУКТУРА МИОКАРДА СТАРЫХ КРЫС С МОДЕЛЬЮ АЛИМЕНТАРНОГО ОЖИРЕНИЯ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ**

Ожирение – это патологическое состояние организма, для которого характерно избыточное накопление жира. Наиболее распространенной формой является ожирение с первичным (алиментарным) фактором патогенеза. Заболевание развивается вследствие избыточного уровня потребления калорий, превышающего расход энергии. Алиментарное ожирение (АО) является значимым фактором риска развития сердечно – сосудистых заболеваний (ССЗ). Научные открытия последних десятилетий в области биологии и медицины доказывают высокую медико-биологическую ценность кордовой крови, как важного источника биологически активных веществ и стволовых клеток, которые успешно используются при лечении различного рода патологических состояний, в том числе и ССЗ часто сопровождающих АО. В настоящее время исследованию, касающиеся изучения механизмов действия препаратов, полученных из кордовой крови на адаптационно-компенсаторные резервы организма экспериментальных животных при АО, отсутствуют. Целью работы было оценить морфологическое состояние тканей и сосудов сердца у экспериментальных животных с моделью АО после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК). Исследования выполнены на белых 24 месячных беспородных крысах-самцах, разделенных на 3 группы: контрольные (интактные) крысы; контрольные крысы с моделью АО; крысы с АО на фоне введения ЯСК КК. Моделирование АО осуществляли по методике В.Г. Баранова путем содержания животных на гиперкалорийном рационе. Размороженный препарат ЯСК КК человека вводили внутривенно, однократно в дозе  $3 \times 10^5 \text{ CD34}^+ \text{ кл/кг}$  веса животных. Животных выводили из эксперимента путем декапитации на 7-е и 30-е сут. после введения ЯСК КК, производя забор кусочков ткани миокарда для гистологического исследования. После эвтаназии сердце животного разрезали в поперечном направлении по венечной борозде, выделенную каудальную часть (желудочки) исследовали гистологическими методами. В ходе гистологического исследования тканей сердца интактных старых животных было показано, что структурная организация миокар-

да соответствовала норме. В срезах ткани миокарда контрольных старых крыс с моделью АО между группами мышечных клеток наблюдалось скопление большого количества жировых клеток. В местах разрастания жировой клетчатки миокардиоциты были истончены и атрофированы. Определялись также диапедезные кровоизлияния, кардиосклероз. Исследование миокарда старых крыс с моделью АО на 7-е сут. после введения ЯСК КК показало, что в кардиомиоцитах наблюдалась гипертрофия мышечных волокон. Отмечались очаги периваскулярного отека, однако лимфо-гистиоцитарных инфильтратов не наблюдалось. У крыс исследуемой группы на фоне введения ЯСК КК выявлена тенденция к снижению количества ядер кардиомиоцитов. Все крупные сосуды были полнокровны, характеризовались нормальной формой просвета, равномерно утолщенными стенками. Вокруг сосудов обнаруживались слабый периваскулярный отек и умеренный кардиосклероз. Изменения сохранялись и на 30 сут. после введения препарата.

#### **Чеснокова Д.В., Жаркова И.И., Кузнецова Е.С., Бонарцев А.П.**

*МГУ им. М.В. Ломоносова*

*daryana8@yandex.ru*

#### **РОСТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МАТРИКСАХ И МИКРОСФЕРАХ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА**

В настоящее время изделия из поли-3-оксибутирата (ПОБ) находят широкое применение во многих разделах биологии и медицины. Этот полимер, получаемый микробиологическим путем, является перспективным биоматериалом для создания биосовместимых и биodeградируемых медицинских изделий для регенеративной медицины. В качестве подложки для культивирования клеток можно использовать полимерные изделия различной формы и микроструктуры: пористые матриксы и микросферы. Особенно важна форма и микроструктура подложки для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК), интерес к использованию которых для регенеративной медицины активно растет в последние годы. Целью данной работы было исследование прикрепления и роста мезенхимальных стволовых клеток в порах 3D-матрикс и на поверхности пористых микросфер из ПОБ различного диаметра. Для создания микросфер использовалась техника эмульгирования гомогенизированной смеси раствора ПОБ с карбонатом аммония (5% w/v), использовавшегося в качестве порообразователя, в растворе ПВА (1%). Изменение скорости эмульгирования и концентрации раствора полимера позволяет менять размеры получаемых частиц. Пористые матриксы были изготовлены с помощью метода двойного выщелачивания с использованием двух пороенов – карбоната аммония и сахарозы с заданным размером кристаллов (94–310 мкм). МСК были выделены из костного мозга крыс и охарактеризованы методом проточной цитометрии с использованием антител к поверхностным маркерам фенотипирования стволовых клеток. С помощью ХТТ-теста был исследован рост МСК *in vitro* на полученных микросферах и в матриксах. Для изучения характера роста МСК спустя неделю инкубации были получены фотографии образцов микросфер и матрикс методом сканирующей электронной

микроскопии. Были получены полимерные микросферы различного диаметра: 125, 350 и 1000 мкм и 3D-матрицы со средним размером пор 115 мкм. Было показано, что МСК прикрепляются и растут как на микросферах, так и в порах 3D-матрицы. Исследование характера роста клеток методом СЭМ показало, что клетки распластаются по поверхности микросфер с диаметром 1000 мкм и формируют монослой. Микросферы со средним диаметром около 125 мкм показали способность образовывать небольшие агрегаты, соединенные клетками. Рост клеток в матрицах происходит в порах матрицы, при этом клетки имеют несколько точек прикрепления, что обеспечивает их 3D-рост. Таким образом, было доказано, что не только матрицы, но и микросферы на основе ПОВ можно использовать в качестве подложки для культивирования МСК. Для дальнейшего изучения применимости данной технологии для регенерации тканей в дальнейшем будут проведены эксперименты *in vivo* на лабораторных животных.

Финансирование исследования: *Грант РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856.*

**Чулпанова Д.С., Колобынина К.Г.,  
Соловьева В.В., Ризванов А.А.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
daryachulpanova@gmail.com

**ПОЛУЧЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕНАМИ-СУПРЕССОРАМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ IN VITRO**

Цитокины представляют собой молекулярные мессенджеры, позволяющие клеткам иммунной системы взаимодействовать друг с другом. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторные и стромальные клетки, тем самым регулируя развитие опухоли и ее микроокружения. Многочисленные *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью. В ряде исследований показана эффективность использования различных комбинаций цитокинов друг с другом и с рядом противоопухолевых препаратов для подавления роста опухоли *in vivo*. Известным онкосупрессором является фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена PTEN. Делеция данного гена часто наблюдается в различных типах опухолей человека. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают иммунологической инертностью и естественным тропизмом к местам локализации опухолей, что делает их перспективными векторами для целевой доставки противоопухолевых агентов. В настоящей работе получены линии МСК из жировой ткани человека со сверхэкспрессией генов TRAIL (лиганд семейства фактора некроза опухоли, индуцирующий апоптоз), IFN $\alpha$ 17 (интерферона альфа 17), IL2 (интерлейкин 2), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и PTEN. На первом этапе работы проводили субклонирование целевых генов из вектора-донора pDONR221 в лентивирусный плазмидный вектор pLX303 (Addgene) методом LR-рекомбинации по технологии Gateway (In vitro gene, США). Продуктами рекомбинации трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli*.

Методом ПЦР-скрининга колоний с использованием ген-специфичных праймеров отбирали положительные клоны и выделяли из них плазмидную ДНК. Правильность сборки плазмидных конструкций была проанализирована рестрикционным анализом с эндонуклеазами рестрикции KpnI и XhoI (ThermoFisherScientific, США) и секвенированием. Рекombинантные лентивирусы были получены путем ко-трансфекции пакующей линии клеток HEK293FT и сконцентрированы ультрацентрифугированием при 26 000 об/мин. Вирусный титр определяли методом проточной цитофлуориметрии по флуоресценции контрольных клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). МСК из жировой ткани человека были модифицированы рекомбинантными лентивирусами, кодирующими гены IFN $\alpha$ 17, TRAIL, PTEN, GM-CSF, IL-2 и gfp с множественностью инфекции (MOI) 10. После генетической модификации была проведена селекция трансдуцированных клеток путем культивирования с антибиотиком бластицидин S в концентрации 5 мкг/мл в течение 10 дней. Сверхэкспрессия целевых генов в МСК после селекции была подтверждена с помощью ПЦР-РВ. В дальнейшем планируется исследование противоопухолевой активности МСК со сверхэкспрессией IFN $\alpha$ 17, TRAIL, PTEN, GM-CSF и IL-2 в культуре опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Финансирование исследования: *Работа поддержана программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

**Чуркова М.Л.**

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России  
mchurkova@gmail.com

**РЕАКЦИЯ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШКИ КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ РАЗНЫХ ДОЗ МЕЛАТОНИНА**

Было показано, что прием мелатонина (MT) в терапевтических дозах (т.д.) дает синхронизирующий биоритмы эффект [Мендель В.Э., 2010], однако у ряда респондентов отмечаются интерстициальные реакции [HaskL.M., 2003, Полуэктов М.Г. 2012]. При пероральном приеме MT, возможно, он может вызвать местную реакцию эпителия, особенно EC-клеток, вырабатывающих мелатонин и серотонин — предшественник мелатонина.

**ЦЕЛЬ.** Исследовать эпителий слизистой оболочки двенадцатиперстной и прямой кишки крыс при введении разных доз мелатонина.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Раствор мелатонина вводили в желудок 15 крыс. В 1 подгруппе (MT-1) в течение месяца — по 1 т.д.; во 2 подгруппе (MT-20) — в течение месяца — по 20 т.д.; в 3 подгруппе (MT-100) — однократно по 100 т.д. Контрольная группа — 15 крыс. Срезы двенадцатиперстной и прямой кишки окрашивали гематоксилином-эозином; EC-клетки выявляли иммуногистохимически (поликлональные антитела против серотонина). Определяли длину ворсинок, глубину крипт; содержание EC-клеток на 1 мм<sup>2</sup> поверхности среза эпителия. Статистическую обработку осуществляли в программе Statistica. 10,  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** У всех экспериментальных крыс в эпителии слизистой оболочки кишки отмечена из-

быточная васкулоляция. Средняя длина ворсинок двенадцатиперстной кишки (в мм) во всех группах исследования была достоверно ниже, чем показатели контрольной группы (MT-1 —  $2,98 \pm 0,14$ ; MT-20 —  $2,04 \pm 0,2$ ; MT-100 —  $2,48 \pm 0,14$ ; контроль —  $3,5 \pm 0,21$ ). Средняя глубина крипт (в мм) при введении 1 т.д. (MT-1) была достоверно выше ( $0,37 \pm 0,01$ ), чем у интактных животных ( $0,26 \pm 0,02$ ), в других подгруппах исследования с ним — сопоставима (MT-20 —  $0,25 \pm 0,02$ ; MT-100 —  $0,21 \pm 0,01$ ). В эпителии слизистой оболочки прямой кишки также отмечалось достоверное увеличение глубины крипт (в мм) при введении больших доз мелатонина (MT-20 —  $1,44 \pm 0,11$ ; MT-100 —  $1,38 \pm 0,04$ ), которое при введении 1 т.д. — не выявлено (MT-1 —  $0,94 \pm 0,05$ ; контроль —  $0,89 \pm 0,09$ ). ЕС-клетки выявлены во всех группах исследования. В эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной и прямой кишки наблюдалось достоверное увеличение их числа в MT-1 (двенадцатиперстная (кл/мм<sup>2</sup>) —  $62,17 \pm 8,0$ ; прямая —  $20,9 \pm 2,1$ ) и MT-20 (двенадцатиперстная (кл/мм<sup>2</sup>) —  $59,31 \pm 8,61$ ; прямая —  $22,8 \pm 4,1$ ) подгруппах исследования. Также, увеличение отмечено в подгруппе MT-100 в двенадцатиперстной кишке ( $47,52 \pm 1,9$ ; контроль —  $17,0 \pm 2,18$ ), тогда как в эпителии прямой — отмечалась лишь тенденция к увеличению данного показателя ( $43,72 \pm 10,2$ ; контроль —  $22,44 \pm 1,88$ ). Увеличение числа ЕС-клеток, можно рассматривать как реакцию местного гомеостаза в ответ на раздражение, способствующее регенерации эпителия и проявляющееся в виде гиперплазии ЕС-клеток.

**ВЫВОДЫ.** При введении разных доз мелатонина отмечаются морфологические перестройки эпителия слизистой оболочки кишки крыс.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов (серия ПСП № 16553).*

**Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А.,  
Можейко Н.П., Гонилова З.З.,  
Севастьянов В.И., Готье С.В.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России  
dr.shagidulin@mail.ru

### **ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПЕЧЕНИ НА КОРРЕКЦИЮ И ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Поиск новых эффективных методов коррекции и лечения пораженной печени, особенно в предтрансплантационном периоде, является актуальной проблемой гепатологии.

**ЦЕЛЬ.** Выбрать оптимальный клеточный состав и соотношение клеток в клеточно-инженерных конструкциях (КИК) печени для коррекции и лечения печеночной недостаточности (ПН).

**МЕТОДЫ.** Работа выполнена на 182 крысах-самцах породы Вистар (220–250 г) и на 25 крысах-самцах породы Август (150–180 г), которые были использованы как доноры аллогенного клеточного материала. Моделирование хронической ПН осуществляли путем инъекции 60% СС14 под кожу в течение 42 сут. Мезенхимальные стволовые

клетки костного мозга (МСК КМ) культивировали в течение 7 сут., а затем сокультивировали 3 сут. совместно с клетками печени (КП). После чего сокультивированные клетки адгезировали на биосовместимый и биodeградируемый гидрогелевый матрикс из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ). После завершения затравки, оставшиеся в живых крысы, были разделены на 7 групп: 1 группа 30 крыс (соотношение КП:МСК КМ = 5:1), 2 группа 20 крыс (соотношение КП:МСК КМ = 10:1), 3 группа 20 крыс (соотношение КП:МСК КМ = 1:1), 4 группа 25 крыс (КП), 5 группа 30 крыс (ММСК  $5 \times 10^6$  клеток), 6 группа 20 крыс (ММСК  $2,5 \times 10^6$  клеток), 7 группа 35 крыс — контроль (физиологический раствор). Выживаемость животных, динамику редукции цитолитического синдрома, синдрома холестаза, морфологию печени и КИК исследовали на протяжении 365 сут. после трансплантации КИК печени. Результаты. В 1–5 группах все животные выжили, показатели цитолитического синдрома и холестаза нормализовались к 30 сут. после трансплантации, причём в 1 группе темп восстановления вышеуказанных показателей был наиболее высокий. В 6 группе внутригрупповая летальность составила 5%. В 7 группе внутригрупповая летальность составила 48,6%, а показатели цитолиза и холестаза в этой группе нормализовались только к 90 сут. после окончания затравки. Через 90 сут. после трансплантации КИК в 1 группе выявлены пролиферирующие аллогенные гепатоциты с высоким содержанием гликогена, пролиферирующий эпителий жёлчных протоков и вновь образованные желчные протоки и сосуды.

**ВЫВОДЫ.** Применение КИК с соотношением КП:ММСК = 5:1 наиболее эффективно корректирует печёночную недостаточность.

**Шанский Я.Д., Сергеева Н.С., Свиридова И.К.,  
Каралкин П.А., Кирсанова В.А.,  
Ахмедова С.А., Фомичева К.А.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России  
tiragarde@gmail.com

### **ЛИЗАТ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЦЕЛЯХ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить функциональные свойства лизата тромбоцитов (ЛТ) человека как безопасной добавки к ростовым средам *in vitro* и стимулятора репарации раневого дефекта кожных покровов *in vivo*.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** ЛТ был получен методом температурного лизиса из тромбоцитарного концентрата доноров по оригинальной запатентованной методике. ММСК, полученные из жировой ткани пациентов, культивировали в полной ростовой среде (ПРС), в состав которой входили пулированный (13 женщин и 15 мужчин) образец ЛТ или эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) в концентрациях 1%, 5%, 10% (контроль). Методом прижизненного мониторинга клеточных культур исследовали способность ЛТ восстанавливать целостность монослоя ММСК в зоне искусственного дефекта. Влияние ЛТ и ЭТС (1–10% от объема среды) на целостность ДНК изучали в тесте ДНК-комет (положительный контроль — цисплатин). Оценку влияния пулированного

образца ЛТ на экспрессию 12 маркерных генов после индукции остео- и адипогенной дифференцировки ММСК проводили методом полимеразной цепной реакции с регистрацией накопления продуктов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Регенеративная активность ЛТ была изучена на модели заживления полнослойного дефекта кожного покрова в аллогенной системе (эксцизионная рана кожных покровов у крыс с последующим нанесением ЛТ в концентрации 20% и 100%; контроль — изотонический раствор NaCl). Методами регистрации служили фото-съемка, гистологические исследования в динамике.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Установлено, что как ЭТС, так и ЛТ в концентрациях 5% и 10% в составе ПРС в сходной степени стимулировали пролиферацию ММСК в течение 14 дней *in vitro*. ЛТ в концентрациях 5% и 10% обеспечивал более быстрое, чем ЭТС, закрытие площади дефекта моно-слоя ММСК. ЛТ, как и ЭТС, не вызывал повреждения ДНК в ММСК в использованных концентрациях. Отмечено, что ЛТ сильнее, чем ЭТС, стимулировал экспрессию генов адипогенной дифференцировки ММСК. Экспрессия генов остеогенной дифференцировки ММСК в присутствии ЛТ снижалась, вероятно, вследствие присутствия в составе ростовой среды гепарина, добавляемого для предотвращения формирования фибринового геля. ЛТ активировал репарацию кожного дефекта *in vivo*: уже к 7 сут. наблюдения отмечалась полная эпителизация области дефекта, являющаяся протектором рубцовых образований, началось созревание грануляционной ткани, а к 13 сут. формировалась сплошной широкий многоядерный эпителий, соответствующий по строению эпителию интактных животных, появлялись зачатки волосяных фолликулов, признаков воспаления не наблюдалось. Данный эффект статистически значимо усиливался с возрастанием концентрации ЛТ с 20% до 100%.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные позволяют заключить, что ЛТ может стать адекватной и безопасной заменой ЭТС для культивирования клеток человека, например, ММСК, в целях регенеративной медицины, а также использоваться при разработке лекарственных средств с регенеративной активностью (для лечения трофических язв, профилактики рубцовых образований и т.д.).

Финансирование исследования: *Соглашение с Минобрнауки России № 14.610.21.0001.06 от 6.10.2014 г.*

**Шаповалова Е.Ю., Морозова М.Н.,  
Барановский Ю.Г., Бойко Т.А.,  
Барановский А.Г.**

*ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет»  
shapovalova\_l@mail.ru*

#### **МОРФОЛОГИЯ СФОРМИРОВАННОГО РУБЦА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ РАНУ АУТО- И ГЕТЕРОФИБРОБЛАСТОВ**

Образование рубца — неизбежное следствие любой хирургической операции [Белоусов А.Е., 2005]. Проблема трансплантации собственных или гетерогенных дермальных фибробластов (Ф), как ключевого фактора репаративной регенерации, в свежую операционную рану кожи с целью профилактики патологического рубцевания актуальна и не получила должного освещения в морфологических исследованиях.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Оценить морфологическое строение, коллагенообразование и ангиогенез в новообразованных рубцах после введения ауто- и гетерофибробластов в первичную хирургическую рану.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование выполнено на 30 белых половозрелых мышах линии С57/В1. Вокруг и в дно экспериментальной кожной раны в лопаточной области (Барановский Ю.Г. с соавт., 2016) вводили 0,4 мл взвеси Ф в ростовой среде DMEMF12 (Lonza) в количестве 1,33 млн клеток. На 23 сутки рубец заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Вейгерту — Ван-Гизону для визуализации эластических и коллагеновых волокон.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** У мышей контрольной группы на 23 сут. после операции образовался нежный белый рубец с четкими границами. На срезах рубца эпидермис (Э) представлен не полностью сформированным многослойным эпителием толщиной  $62,32 \pm 0,12$  мкм. Дерма (Д) рубца не образует сосочков вдающихся в эпидермис. Сосочковый и сетчатый слои Д не разграничиваются и образованы равномерно локализованными коллагеновыми волокнами (КВ), между которыми присутствуют клетки, преимущественно Ф. КВ занимают  $81,52 \pm 0,22\%$  от площади Д. Кровеносные капилляры (КК) не расширены и их площадь составляет в среднем  $2,66 \pm 0,12\%$ . Волосяные фолликулы в зоне рубца не обнаружены. У мышей после введения гетерофибробластов Э полностью сформирован и состоит из четырех слоев, толщина Э составляет  $74,54 \pm 14$  мкм. Дерма рубца образует сосочки, вдающиеся в Э. Волосяные фолликулы на стадии формирования. Сосочковый и сетчатый слои Д слабо разграничиваются. Непосредственно под базальной мембраной Э присутствует фиброзирующаяся соединительная ткань, где КВ образуют тонкую сеть. Более глубокий сетчатый слой состоит из толстых КВ с небольшим количеством Ф. КВ занимают в среднем  $67,94 \pm 0,15\%$  от площади Д, а КК —  $2,08 \pm 0,16\%$ . У мышей на фоне введения аутофибробластов толщина Э, имеющего все четыре слоя кератиноцитов, составила  $78,98 \pm 0,17$  мкм. В Д рубца под базальной мембраной Э лежит тонкий слой соединительной ткани с нежной сеткой КК. Глубже эти волокна формируют толстые преимущественно параллельно ориентированные пучки. КВ и КК занимают в среднем  $56,63 \pm 0,16\%$  и  $1,73 \pm 0,07\%$  площади Д. Таким образом, трансплантация в хирургическую рану взвеси гетеро- или аутофибробластов увеличивает толщину Э на  $16,39\%$  и  $21,09\%$ , снижает площадь КВ на  $16,66\%$  и  $30,30\%$  и снижает площадь КК на  $21,8\%$  и  $34,96\%$  соответственно. Исследования ряда авторов выявило, что общее количество Ф и их пролиферативная способность в Д кожи взрослого человека относительно невелики и с возрастом прогрессивно уменьшаются [Петров В.В с соавт., 2012]. Введение в первичную рану активных Ф изменяет сроки заживления и меняет характеристики рубца в лучшую сторону. Наилучшие морфологические характеристики Э и фиброзирующейся грануляционной ткани рубец имеет после введения аутофибробластов.

Финансирование исследования. *Работа под-держана проектом «Сеть академической мобильности «РНИЭМ» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» и выполнена с использовани-*

ем инфраструктуры ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова.

**Шаронов Г.В.<sup>1</sup>, Балацкая М.Н.<sup>2</sup>,  
Гончарук С.А.<sup>3</sup>, Белоглазова И.Б.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М.Шемякина  
и Ю.А.Овчинникова РАН

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup> Биологический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии»  
Минздрава России  
sharonov@gmail.com

### **ЛИПИД-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ НАВИГАЦИОННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, ИХ МЕХАНИЗМЫ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В МОРФОГЕНЕЗЕ КЛЕТКИ**

В живом организме все процессы скоординированы. Координация есть на всех уровнях структурной организации, в том числе на клеточном и субклеточном. Движение и изменение формы клетки в процессе морфогенеза является ярким примером координации множества молекулярных реакций во всех областях клетки, для чего существуют механизмы быстрой коммуникации между разными участками клетки. Некоторые посредники такой коммуникации хорошо известны — это кальций, цАМФ, пероксид водорода, инозит-3-фосфат. Однако, их недостаточно для координации морфогенеза клетки, при котором основная активность сосредоточена на плазматической мембране. В исследованиях клеточного морфогенеза сейчас все большее внимание уделяют коммуникациям посредством липидов и цитоскелета, однако их механизмы остаются неясными. В своей работе мы изучали навигационные рецепторы, т.е. рецепторы, инициирующие изменение морфологии и/или положения клетки в ответ на внешние стимулы. Это были рецепторы из различных суперсемейств: рецепторная тирозиназная киназа EphA2, рецептор нейротрофических факторов p75NTR, гликозилфосфатидилинозит-заякоренные белки эфрин-A1 и uPAR. Мы обнаружили, что активность и свойства этих рецепторов взаимозависимы. Установлено, что экспрессия p75NTR влияет на уровень поверхностной экспрессии, подвижность и активность других рецепторов. Активация p75NTR фактором роста нервов снимает эти эффекты и даже изменяет их знак. При этом прямого взаимодействия между рецепторами не выявлено, а их взаимное влияние более выражено при низких уровнях экспрессии. Мы предположили, что взаимосвязь между рецепторами опосредована фосфатидилинозит-фосфатами (ФИФ). Известно, что ФИФ взаимодействуют с исследуемыми рецепторами и влияют на их поверхностную экспрессию, подвижность и активность. Ограниченное количество ФИФ на плазматической мембране приводит к конкуренции рецепторов за этот компонент, что объясняет зависимость взаимовлияния рецепторов от уровня их экспрессии. Для проверки гипотезы об участии ФИФ в коммуникации между рецепторами мы ввели точечные аминокислотные замены в p75NTR и EphA2, дестабилизирующие их взаимодействие с ФИФ. Мутантные фор-

мы рецепторов утратили чувствительность к другим рецепторам, что свидетельствует в пользу нашей гипотезы. ФИФ является необходимым кофактором ГТФаз, регулирующих перестройку примембранного цитоскелета и везикулярного транспорта — процессов, играющих центральную роль в морфогенезе клетки. На основании наших и литературных данных мы предлагаем схему координации клеточной адгезии, перестройки примембранного цитоскелета и везикулярного мембранного транспорта, учитывающую конкуренцию ключевых регуляторов этих процессов за ФИФ.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-24-00086) и частично с использованием оборудования ЦКП ИБХ (УИН RFMEFI62117X0018).*

**Шафеев Е.В.**

Институт биологии развития им. Кольцова  
elenamallakhova@gmail.com

### **КЛЕТКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO ПРОЯВЛЯЮТ СПОСОБНОСТЬ К НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ**

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) образуется из одной нейроэпителиальной закладки с нейронами сетчатки, благодаря этому клетки РПЭ могут быть использованы для терапии сетчатки после повреждений. В определенных условиях РПЭ может проявлять пластичность, меняя свой путь дифференцировки. Так, РПЭ низших позвоночных способны репрограммироваться в мультипотентные клетки, способные дифференцироваться во все типы клеток сетчатки и полностью восстанавливать её после повреждений (Grigoryan, 2015). Одним из ключевых факторов де- и трансдифференцировки является основной фактор роста фибробластов (bFGF). Целью работы было исследовать возможности к нейральной дифференцировке клеток РПЭ человека под влиянием bFGF. В работе была использована линия клеток РПЭ человека ARPE-19. Культивирование осуществляли в среде DMEM/F-12, дополненной 10% ЭТС, L-глутамином, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование клеток проводили смесью растворов 0.25% трипсина и 0.48 мМ версена в соотношении 1:3. Для оценки действия bFGF добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с разным содержанием ЭТС (0 или 1%). Контролем служили клетки, культивированные без bFGF. Для оценки дифференцировки использовали иммуноцитохимическое окрашивание и ПЦР в реальном времени. Оценку пролиферативной активности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Данные иммуноцитохимического анализа выявили понижение эпителиальной и начало нейрональной дифференцировки ARPE-19 под действием bFGF. По мере культивирования снижалась интенсивность окрашивания на Sx43 (ключевой белок щелевых контактов, играющий важную роль в дифференцировке РПЭ) и увеличивалась интенсивность окрашивания на TUBB3 (маркер ранней фазы дифференцировки нейронов сетчатки: колбочек, горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток), в том числе в клетках с аксоноподобными отростками. Через 120 ч. Sx43-окрашивание определялось на поверхности лишь небольшого числа клеток. Около 20% клеток

приобрели нейроноподобную морфологию и длинные аксоноподобные отростки, дающие выраженное положительное окрашивание на маркеры нейральной дифференцировки. ПЦР в реальном времени подтвердил данные иммуноцитохимического исследования. Впервые показано, что после добавления bFGF в клетки РПЭ резко возростала экспрессия мРНК гена плюрипотентности KLF4, которое сопровождалось значимым падением экспрессии PAX6, MITF и OTX2, что свидетельствовало о дедифференцировке РПЭ. С течением времени уровень экспрессии мРНК KLF4 снижался, что сопровождалось трехкратным ростом экспрессии мРНК TUBB3, и одновременно возвратом экспрессии PAX6, MITF и OTX2 к базовому уровню. Проведенное исследование показало, что bFGF имеет двойственное влияние на ARPE-19: активировать мультипотентный статус клеток, а затем направлять их по пути нейральной дифференцировки.

**Онопrienko Г.А., Волошин В.П.,  
Шевырев К.В.**

*ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»  
skv-moniki@yandex.ru*

#### **РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Проведен комплекс экспериментальных исследований на животных (собаки) по моделированию различных повреждений и последствий повреждений длинных трубчатых костей, наиболее распространенных в клинической практике. Визуализация микроциркуляторного русла костной ткани осуществлена с использованием собственных оригинальных методик. Выявлена высокая устойчивость компактной костной ткани диафиза к продолжительной посттравматической ишемии за счет возможности интерстициального пространства костного матрикса обеспечивать адекватный объем внесосудистой микроциркуляции кровеносной плазмы и тканевой жидкости. Установлено также длительное сохранение функции микроциркуляторного русла костной ткани до восстановления естественного кровотока по мере развития сосудистых коллатералей. При диафизарных переломах динамика репаративных процессов в условиях обеспечения и сохранения плотного контакта костных фрагментов на весь период консолидации стереотипна и наблюдается практически после всех видов стабильного остеосинтеза (включая интрамедуллярный с рассверливанием внутрикостной полости). При этом констатируется прямой остеогенез, где пролиферирующая микроваскулярная сеть и остеогенная клеточно-волоконистая ткань, исходящие из медуллярной полости и гаверсовой системы кортикальных пластинок концов отломков, формируют эндостально-кортикальный костный регенерат небольшого объема и без соединительнотканых элементов, а также без заметного периостального костеобразования. Различия — лишь в сроках и масштабах репаративных процессов, которые полностью обусловлены «первичными» циркуляторными расстройствами, т.е. наступившими однократно в результате непосредственно травмы и последующего хирургического вмешательства (osteosynthesis). Проведенные экспериментальные исследования косвенно свидетельствуют о наличии взаимно-остео-

индуцирующего воздействия концов костных фрагментов. С учетом данных литературы, это может быть обусловлено мощным остеоиндуцирующим воздействием костных морфологических белков «молекулярных регуляторов остеогенеза». Остеоиндуцирующее взаимодействие костных фрагментов максимально при наличии их плотного контакта и минимально при диастазе до величины поперечника диафиза. В случаях наступления нестабильности остеосинтеза непрерывный поток клеточного распада индуцирует избыточную сосудистую пролиферацию на фоне сохранения тканевой гипоксии, отсутствия оксигенической среды для реализации остеобластогенеза. Пролиферирующий пул стволовых стромальных клеток-предшественников на периостальной поверхности концов отломков дифференцируется в направлении фибро- и хондрогенеза. Периостальный остеогенез при этом является фактически резервным источником костеобразования, который проявляется в недостаточно стабильных условиях. Наибольшие деструктивные последствия наступают при нестабильности металлического имплантата.

**Шехтер А.Б., Курков А.В., Файзуллин А.Л.**

*Институт регенеративной медицины,  
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет)  
a.shehter@yandex.ru*

#### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Тканевая инженерия в настоящее время считается ведущим направлением в регенеративной медицине. Тканеинженерные конструкции (ТИК), состоящие из скаффолдов (матриц) и культивируемых на них клеток, используются в реконструктивных операциях в разных областях медицины. Предложены многочисленные скаффолды из самых разнообразных натуральных, синтетических и гибридных биоматериалов. К скаффолдам предъявляются следующие требования: 1) адекватные механические свойства; 2) биосовместимость (отсутствие токсигенных, иммуногенных и аллергенных свойств); 3) регулируемая биодеградация; 4) отсутствие выраженных воспалительных и дистрофических тканевых реакций; 5) замещение в нужные сроки тканями организма без рубцевания. Желательно, чтобы скаффолд обладал пористой структурой, обеспечивающей прорастание сосудов и клеток реципиента. Для адекватной оценки перспективности скаффолдов необходимы сравнительные морфологические исследования самих скаффолдов и тканевой реакции на их имплантацию *in vivo*. К сожалению, такие исследования в научной литературе немногочисленны. Мы располагаем большим опытом морфологического исследования различных скаффолдов на основе коллагена, гиалуроновой кислоты, хитозана, растворимых полимеров, а также гибридных материалов с использованием гистохимии, специальных светоптических методик, сканирующей и трансмиссионной электронных микроскопий, мультимедийной и атомно-силовой микроскопии. Изучалась структура скаффолдов, их биосовместимость, биодеградация и тканевая реакция при имплантации в жировую клетчатку и в мышцы, а также при тканевой инженерии уретры, трахеи, хряща и кости. Проводилось сравнительное изучение скаффолдов на основе ре-

конструированного из раствора коллагена, гибридного коллаген-викрилового материала, коллагенсодержащих децеллюляризованных тканей (дермы кожи, подслизистой оболочки кишки, стенок артерий и вен, стенки мочевого пузыря, перикарда и твердой мозговой оболочки). Была изучена структура скаффолдов, влияющая на их свойства *in vivo*. Были определены особенности скаффолдов для различных целей тканевой инженерии в соответствии со структурой и функцией тканей и органов. Все материалы обладали биосовместимостью, вызывали слабую и проходящую воспалительную реакцию, окружались соединительнотканной капсулой. Механизмами деградации являлись макрофагальная резорбция и бесклеточный лизис. Преимущество пористых материалов заключалось в более быстром прорастании их фибробластами и васкуляризация. Однако, срок их резорбции был не выше 10–14 сут. Биодеградация, фиброз, способность усиливать регенерацию тканей и органов, а также результативность пластических операций различались в зависимости от структуры скаффолдов и условий имплантации. Результаты исследования используются для разработки новых и оптимизации имеющихся скаффолдов и тканеинженерных конструкций, а также классических имплантатов в регенеративной медицине.

**Шилина М.А., Гринчук Т.М., Алексеенко Л.Л., Анацкая О.В., Виноградов А.Е., Зенин В.В., Никольский Н.Н.**

ФГБУН «Институт цитологии» РАН  
shili-mariya@yandex.ru

#### **ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO**

Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине с каждым годом получает все большее развитие. В качестве источника МСК до недавнего времени чаще всего служил костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь. Сравнительно недавно описан новый тип МСК, который получают из эндометрия (эМСК). Доступность, возможность неинвазивного метода получения исходного материала, высокая пролиферативная активность и мультипотентность эМСК не только ставят их в один ряд с другими, более изученными типами МСК, но и указывают на некоторые преимущества. В целях регенеративной медицины крайне важным является вопрос о генетической стабильности и возможности спонтанной трансформации клеточного продукта. В представленной работе были исследованы эМСК, полученные от здоровых доноров, от донора с заболелением репродуктивной системы (аденомиозом) и потомки клеток, переживших сублетальный температурный стресс. Изученные клеточные варианты экспрессировали маркеры, типичные для МСК, дифференцировались в клетки мезенхимального ряда. Генетические линии эМСК в условиях *in vitro* характеризовались возникновением кариотипически дефектных клеток — анеуплоидов и клеток с нарушениями в структуре хромосом. Частота встречаемости аберрантных клеток была индивидуальна для каждой линии. Клеточные варианты от донора с аденомиозом характеризовались повышенным уровнем кариотипической нестабильности с неслучайным вовлечением в перестройки (поломки) хромосом 7 и 11. Часть популяции эМСК, претерпевших сублетальный ТШ, подвергалась стресс-индуцированному

преждевременному старению (SIPS). Потомки клеток, избежавших SIPS, характеризовались вспышкой кариотипической нестабильности, с вовлечением в перестройки большей части кариотипического набора. Методы молекулярного кариотипирования и транскриптомного анализа, несмотря на существенную кариотипическую нестабильность, возникшую у потомков эМСК после ТШ, не выявили признаков клеточной трансформации. эМСК всех проанализированных линий в процессе длительного культивирования входили в фазу репликативного старения и погибали. Результаты данной работы позволяют сделать вывод о том, что изученные нами клеточные линии не подверглись иммортализации и трансформации.

Финансирование исследования: *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 14-50-00068.*

**Шилова Н.А., Чаша Т.В., Кузьменко Г.Н.**

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России  
shilova37@gmail.com

#### **СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК БРОНХОЛЕГОЧНОЙ СИСТЕМЫ У ГЛУБОКОНЕДОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ**

Одними из эпителиальных клеток дыхательных путей являются клетки Клара (КК), выстилающие терминальные бронхиолы. Установлено, что КК выступают в роли стволовых клеток и служат источником для пополнения собственной популяции, а также популяции реснитчатых клеток. КК синтезируют низкомолекулярный белок — белок клеток Клара (БКК). Этот белок ингибирует активность провоспалительных факторов (фосфолипазы А2 и С, фактора некроза опухоли, интерлейкина1) и эластазу полиморфноядерных лейкоцитов, влияет на миграцию моноцитов и фагоцитов, подавляет хемотаксис фибробластов. Кроме того, БКК способствует детоксикации вредных веществ, участвует в инактивации токсинов, предупреждает слипание бронхиол. КК являются одним из источников апопротеинов А и В альвеолярного сурфактанта и жидкого нелипидного компонента гипофазы [1–3]. Цель исследования — установить активность стволовых клеток бронхолегочной системы (клеток Клара) по содержанию белка клеток Клара в бронхо-альвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) у недоношенных новорожденных.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Обследовано 106 недоношенных новорожденных (гестационный возраст менее 32 нед.) с массой тела при рождении менее 1500 грамм с дыхательными нарушениями. Выделены 2 группы наблюдения: 1-я группа — 41 новорожденный с респираторным дистресс-синдромом (РДС), 2-я группа — 65 детей, имевших, кроме РДС, клинико-лабораторные признаки врожденной пневмонии. Содержание БКК в БАЛЖ определяли методом ИФА. Уровень БКК в БАЛЖ у детей 2 группы ( $87,19 \pm 13,8$  нг/мл) был значительно выше ( $p = 0,01$ ), чем у детей, имевших лишь признаки РДС ( $41,37 \pm 27,8$  нг/мл). Это можно объяснить возрастанием пролиферативной активности КК и увеличением синтеза ими специфического противовоспалительного протеина в ответ на развитие воспаления в легочной ткани, что имеет защитный характер. Оценка уровня БКК в зависимо-

сти от массы тела при рождении у новорожденных с врожденной пневмонией показала, что у детей, родившихся с массой тела при рождении менее 1000 г содержание этого белка в 1,7 раза ниже в лаважной жидкости ( $57,47 \pm 16,2$  нг/мл), чем у детей с массой тела от 1000 до 1500 г ( $99,84 \pm 22,43$  нг/мл), что, возможно, связано с глубокой незрелостью легких и невозможностью синтезировать необходимое количество этого протеина у пациентов с массой тела при рождении менее 1000 г. Т.о., активность стволовых клеток бронхолегочной системы увеличивается при врожденной пневмонии и она ниже у детей с массой тела при рождении менее 1000 г.

#### Литература:

1. Боркина А. Н. Роль клеток Клара в гистофизиологии бронхиального эпителия и их значение в развитии легочной патологии // Пульмонология. — 2007. — № 5. — С. 95-99.
2. C. Herman, M. Petrek, V. Kolek et al. 16kDa белок клеток Клара (CC16) как маркер целостности аэрогематического барьера при саркоидозе / EurRespirJ 2001; 18:507-514.
3. Schrama A.J., Bernard A., Poorthuis B. J. et al. Cord blood Clara cell protein CC16 predicts the development of bronchopulmonary dysplasia. Eur J Pediatr. 2008 Nov; 167(11): 1305-1312.

#### **Шитиков С.А., Быкова Н.А., Кучмий А.А., Ефимов Г.А.**

Лаборатория Трансплантационной Иммунологии  
sheetikov.savely.2013@post.bio.msu.ru

#### **ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ НАИВНЫХ CD8+ Т-ЛИМФОЦИТОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МИНОРНЫМ АНТИГЕНАМ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ АСС-1У И НА-2 В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

В настоящее время наиболее эффективным методом лечения злокачественных заболеваний кровяной системы является химиотерапия с последующей трансплантацией аллогенных стволовых клеток крови (алло-ТГСК). Эффективность трансплантации определяется возникновением иммунного ответа против гемопоэтической системы реципиента, в том числе против выживших опухолевых клеток (реакция «трансплантат против опухоли», РТПО). Однако слишком интенсивный ответ может привести к повреждению здоровых тканей реципиента (реакция «трансплантат против хозяина», РТПХ). В случае полного совпадения между донором и реципиентом по аллелям главного комплекса гистосовместимости (HLA), мишенями аллореактивного ответа являются пептиды, которые презентуются в комплексах HLA только на поверхности клеток реципиента, но отсутствуют у донора. Такие пептиды называются минорными антигенами гистосовместимости (MiHA). Лимфоциты донора, попадая в организм реципиента, способны распознавать MiHA как чужеродный антиген, поскольку в ходе негативной селекции в тимусе донора этот антиген не презентировался, в результате чего MiHA-специфичные клоны не были элиминированы из Т-клеточного репертуара. Существование MiHA обусловлено наличием несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов в геноме человека. Разные MiHA обладают разной иммуногенностью, т.е. разной способностью вызывать иммунный ответ *in vivo*. В соответствии с нашей гипотезой, это может объясняться неодинаковой частотой встречаемости наивных MiHA-специфичных Т-клеток в крови донора, что определяет вероятность попадания таких клеток в трансплантат и в организм реципиента.

В данной работе сравнивались частоты встречаемости наивных Т-клеток, способных распознавать высокоиммуногенный антиген НА-2 и низкоиммуногенный антиген АСС-1У. В ходе исследования нами были отобраны доноры, в геноме которых не было представлено аллельного варианта полиморфизма, приводящего к возникновению пептидов исследуемых минорных антигенов. Прямые методы детекции МНС-тетрамерами наивных антиген-специфичных Т-клеток в крови недостаточно чувствительны в связи с очень малым количеством таких клеток. Поэтому НА-2 и АСС-1У-специфичные Т-клетки были сначала размножены при помощи *in vitro* стимуляции наивных Т-клеток аутологичными дендритными клетками, нагруженными синтетическими пептидами минорных антигенов. Специфичность Т-клеток подтверждалась окрашиванием каждой культуры МНС-тетрамерами, нагруженными соответствующими пептидами. Частота встречаемости MiHA-специфичных клеток была подсчитана при помощи протокола предельного разведения. Среди опробованных методов определения частоты встречаемости MiHA-специфичных наивных Т-клеток наиболее эффективным оказался анализ Т-клеточных культур после антиген-специфичной экспансии. Согласно полученным результатам, частота встречаемости НА-2-специфичных наивных Т-клеток ( $f_{\text{НА-2}} \approx 5 \times 10^{-6}$ ) существенно выше, чем для АСС-1У ( $f_{\text{АСС-1У}} \approx 2 \times 10^{-7}$ ), соответствует более высокой иммуногенности НА-2 *in vivo* и подтверждает предложенную гипотезу.

Финансирование исследования: Грант РФФ № 17-15-01512.

#### **Шкомова Е.М.**

Философский факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
EShkomova@yandex.ru

#### **КОНЦЕПЦИЯ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ: БИОЭТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ**

«Качество жизни» является сложным понятием, которое включает в себя множество аспектов, таких как качество питания, одежды, комфорт жилища, качество здравоохранения, образования, сферы обслуживания, окружающей среды, структура досуга, степень удовлетворения потребностей в содержательном общении, знаниях, творческом труде, уровень стрессовых состояний, структура расселения и т.д.. Однако при всем многообразии выделенных аспектов отметим, что в современных условиях одним из ключевых становится медицинский аспект, основанный на показателях, которые связаны со здоровьем человека. Доминирование именно медицинского аспекта в понимании «качества жизни» представляется закономерным в связи с углублением медиализации жизни, процесса, в результате которого сущность психического и/или физического состояния человека начинает рассматриваться как сфера компетенции медицины. Регенеративная медицина — одно из передовых и интенсивно развивающихся направлений современной медицинской науки и практики — направлена, в частности, на улучшение качества жизни пациентов. Разработки в области регенеративной медицины представляются перспективными для преодоления одной из основных проблем, стоящих перед современной трансплантологией — отторжения донорских органов и тканей.



Напомним, что с появлением в 1980 г. иммунодепрессанта циклоспорина начинается процесс становления трансплантологии в качестве рутинного метода лечения тяжелобольных пациентов, а качество жизни на послеоперационном этапе трансплантации обеспечивается приемом препаратов, подавляющих реакцию отторжения. Несмотря на то, что благодаря разработке и применению иммунодепрессантов нового поколения удалось снизить риски отторжения пересаженных органов и тканей, их применение сопровождается большим спектром побочных эффектов, что негативно сказывается на качестве жизни реципиентов. Одним из наиболее опасных побочных эффектов от применения любого иммунодепрессанта является повышенный риск развития новообразований и инфекционных заболеваний. Технологии, направленные на то, чтобы сделать аллотрансплантат «невидимым» для иммунной системы, позволят избежать вышеуказанных проблем, однако происходит актуализация философских вопросов о границах допустимого вмешательства в психофизическую целостность человека, об этико-философских основаниях допустимости использования эмбриональных стволовых клеток, о возможности определения индивидуальности человека в контексте знания о его молекулярно-генетической природы и т.д.

**Шпичка А.И.<sup>1</sup>, Королева А.В.<sup>2</sup>, Дайвик А.<sup>2</sup>, Тимашев П.С.<sup>1</sup>, Чичков Б.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова*

<sup>2</sup> *Laser Zentrum Hannover e.V.*  
ana-shpichka@yandex.ru

#### **DESIGN OF A HYDROGEL-BASED MICROFLUIDIC DEVICE FOR VESSEL-ON-A-CHIP SYSTEMS**

To date, one of the main global trends is the development of lab-on-a-chip systems, which permit us to study processes in conditions mimicking in vivo environment. These systems are particularly interesting for the pharmaceutical industry because they enable the increase in speed of drug development and provide standard conditions for drug screening and testing. As they are an essential part of an organism, blood vessels are one of the critical points for lab-on-a-chip development. Therefore, we sought to design a microfluidic device based on fibrin hydrogel, which can mimic a blood vessel. We studied 3D coculture of vasculogenic cells within a synthetically modified fibrin hydrogel. Fibrinogen was covalently linked with PEG-NHS to improve its degradability level and physical-optical properties. We studied the influence of the degree of protein PEGylation and the thrombin concentration used for the gelation on cell responses. Scanning electron microscopy analysis showed that the PEGylation degree and the thrombin concentration strongly influenced microstructural characteristics of the protein hydrogel. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human adipose-derived stem cells (hASCs), used as vasculogenic co-culture, could grow in 5:1 PEGylated fibrin gels prepared using 0.2 U thrombin per 1 protein mg. This gel formulation supported hASCs and HUVECs spreading and the formation of cell extensions and cell-to-cell contacts. Expression of specific ECM proteins and vasculogenesis inherent cellular enzymatic activity were investigated by immunofluorescent staining, gelatin zymography, western blot, and RT-PCR analysis. After evaluation of the optimal gel composition and PE-

Gylation ratio, this hydrogel was utilized to investigate vascular tube formation within a perfusable microfluidic system. The morphological development of this coculture within a perfused hydrogel system for 12 days led to the formation of the interconnected HUVEC-hASC network. The demonstrated PEGylated fibrin microfluidic approach can be used for incorporating other cell types and represents a unique experimental platform. The work of the authors is supported financially by the grant from the Sechenov First Moscow State Medical University, Russia.

Финансирование исследования: *The work of the authors is supported financially by the grant from the Sechenov First Moscow State Medical University, Russia.*

**Штильман М.И., Артюхов А.А., Кусков А.Н., Горячая А.В., Куликов П.П., Лусс А.Л.**

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева*  
shtilmanm@yandex.ru

#### **БИОМАТЕРИАЛЫ – ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ**

Область создания, исследования и применения биоматериалов, т.е. материалов, изделия и препараты на основе которых функционируют в условиях взаимодействия с биологическими объектами, в последние десятилетия сформировалась в важное направление, играющее во многих случаях ключевую роль в решении задач наук и технологий, оптимизирующих жизнедеятельность человека и других живых организмов, объединяемых понятием life sciences and technology – медицины, биотехнологии, косметической и пищевой промышленности, сельского хозяйства и др. Важнейшее место среди биоматериалов занимают полимеры, которые наряду с неорганическими углеродными материалами и металлами широко используются для создания различных объектов медико-биологического назначения – имплантатов, биологически активных систем, искусственных биокатализаторов, биоаналитических систем, биodeградируемых материалов общего назначения и т.п. При этом особенно интенсивно развиваются направления, связанные с использованием биоматериалов в таких областях, как создание материалов с заданными сроками разрушения в биологических системах (в первую очередь на основе сложных полиэфиrow синтетического и биосинтетического происхождения), компонентов лекарственных систем, обладающих векторными свойствами, материалов для биоинженерных процессов, в частности, тканевой инженерии для регенеративной медицины, а также генной инженерии при использовании перемещения генетического материала методом трансфекции. Можно ожидать дальнейшую интенсификацию работ в этом направлении, разработку новых объектов, отличающихся важными полезными характеристиками, и увеличение информационного потока в этой области.

*Литература:*

1. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. – М.: Академкнига, 2005. – 415 С
2. М.И.Штильман и др. Технология полимеров медико-биологического назначения (Полимеры природного происхождения)–М.:БИНОМ,2015. – 328 с.
3. Shtilman M.I. Bioactive Systems. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials., Taylor & Francis, 2016, pp. 469-474.

4. Shtilman M.I. Biodegradation. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials., Taylor & Francis, 2016, pp. 804-816.

**Шутин А.А.<sup>1</sup>, Попов С.В.<sup>1</sup>,  
Михайличенко В.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

<sup>2</sup> Медицинская академия им. С.И. Георгиевского  
shtaa60@gmail.com

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ**

Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) находит применение в различных областях регенеративной медицины в качестве источника многочисленных факторов роста, стимулирующих репаративные процессы.

ЦЕЛЬЮ данного исследования являлось изучение возможности применения обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении посттравматической нейропатии периферических нервов верхней конечности. В исследование было включено 38 больных с посттравматической компрессионно-рубцовой нейропатией периферических нервов верхней конечности, распределенных на основную и контрольную группы по 19 человек соответственно. Мужчин было 26 (68,42%), женщин — 12 (31,58%). Возраст пациентов варьировал от 21 до 55 лет (средний — 41,7±5,3). Повреждения правой верхней конечности были у 21 (55,26%) больного, левой — у 17 (44,74%). Нарушения функции периферических нервов возникли вследствие открытой травмы у 27 (71,05%) больных, закрытых — у 11 (28,95%). По механизму повреждения преобладали высокоэнергетические травмы — 29 (76,32%), в том числе повреждения вращающимися механизмами — 13, огнестрельные — 9, удары и сдавление тяжелыми предметами и конструкциями — 7. Послеоперационные повреждения нервов имели место у 4 пациентов. Всем больным были произведены операции микрохирургического периздновеолиза. Пациентам основной группы дополнительно вводили в зону невролиза ОТП, контрольной — 1% раствор лидокаина в равных объемах. Исследовали уровень болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале боли (ВАШ), скорость проведения возбуждения по нерву, амплитуду М-ответа в сроки 4, 12, 24 нед. после операции. Установлено, что при применении ОТП болевой синдром регрессирует в более короткие сроки в сравнении с контрольной группой, а чувствительные и двигательные функции имеют тенденцию к более раннему восстановлению. Выявлено достоверное увеличение скорости проведения возбуждения в основной группе в срок 4 нед. от момента операции. В более отдаленные сроки различия между группами статистически не достоверны. Побочных эффектов введения ОТП не установлено.

**ВЫВОДЫ.** Эпинеуральное введение обогащенной тромбоцитами плазмы является безопасным методом и оказывает стимулирующее влияние на течение нейрорегенераторных процессов после операции микрохирургического периздновеолиза периферических нервов. При эпинеуральном введении обогащенной тромбоцитами плазмы болевой синдром регрессирует в более короткие сроки в сравнении с контрольной группой, а чувствительные и двига-

тельные функции имеют тенденцию к более раннему восстановлению. Установлено достоверное увеличение скорости проведения возбуждения по периферическим нервам после локального введения обогащенной тромбоцитами плазмы в сроки до 4 недель от момента операции. Положительные эффекты обогащенной тромбоцитами плазмы наиболее отчетливо проявляются в ранние сроки после операции, однако в более отдаленном периоде имеют тенденцию к угасанию.

**Шперлинг И.А.<sup>1</sup>, Юркевич Ю.В.<sup>1</sup>,  
Шулепов А.В.<sup>1</sup>, Шперлинг М.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт» Министерства обороны РФ

<sup>2</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ  
soash@mail.ru

### **РЕГИОНАРНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Компрессионная травма является актуальной проблемой, как в мирное, так и в военное время. Большое количество пострадавших со сдавлением мягких тканей наблюдается при катастрофах, землетрясениях, обвалах в шахтах, при взрывных работах. Быстро извлечь пострадавших из-под развалин до развития необратимых изменений в тканях не всегда возможно из-за обширности разрушений и одномоментного поступления большого количества раненых. Оказание помощи пациентам с компрессионными повреждениями мягких тканей основывается на проведении комплекса мероприятий, направленных на скорейшую детоксикацию организма, устранение метаболических расстройств и восстановление трофики тканей. В последние годы увеличилось число исследований, посвященных применению продуктов клеточных технологий (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) и др.) при лечении различных травм. Применение подобных клеточных средств регенеративной терапии позволяет обосновать новые подходы к лечению повреждений мягких тканей. Эксперименты проведены на 71 крысе, у которых моделировали компрессионную травму мягких тканей тяжелой степени (сила сдавления 12 кг/см<sup>2</sup>, продолжительность — 7 ч.). Все животные были разделены на группы: I — животные, которым в область повреждения вводили культивированные ММСК человека в геле гиалуроновой кислоты (26); II — животные, которым вводили гель гиалуроновой кислоты (контроль 1) (24); III — животные, у которых применяли 0,9% раствор натрия хлорида (контроль 2) (21). Введение препаратов производилось в раннем посткомпрессионном периоде. Функциональное состояние мышц оценивали по данным, полученным при измерении изометрической силы одиночного мышечного сокращения (СМС-О) и мышечного сокращения в режиме тетануса (СМС-Т) икроножной и камбаловидной мышц голени в ответ на стимуляцию седалищного нерва электрическими импульсами по методике описанной Natsu K. et al. (2004). Измерение силы мышечного сокращения производили вначале на неповрежденной, а затем на поврежденной конечности, после чего вычисляли

силовые отношения по формулам. Контрольные измерения производили через 7, 14 и 28 сут. после введения препаратов. Исследования показали, что применение ММСК обеспечивало в ранний посткомпрессионный период повышение СМС-О на 9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой 2. В дальнейшем, сила мышечного сокращения увеличивалась во всех группах. К концу 28 сут. в группе животных, которым вводили ММСК, наблюдалось увеличение СМС-О до  $47,5 \pm 3,2\%$  при  $p < 0,05$ , что на 23% ( $p < 0,05$ ) и на 15% ( $p < 0,05$ ) больше, чем в контрольных группах 1 и 2 соответственно. Продолжительная компрессия мягких тканей приводила к снижению силы мышечного сокращения в режиме тетанус. Введение ММСК, приводила к увеличению СМС-Т на 11% ( $p < 0,05$ ) относительно контрольной группы 1 и на 21% ( $p < 0,05$ ) относительно группы контроля 2. Спустя 14 сут. после введения ММСК наблюдалось увеличение СМС-Т до 59% относительно силы нетравмированных животных, что на 22% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с показателями в контрольной группе 1. Через 28 сут. после введения ММСК вызывало увеличение СМС-Т до 67%, при  $p < 0,05$ , что на 28% ( $p < 0,05$ ) и на 33% ( $p < 0,05$ ) превышало средние результаты оценки СМС-Т в группах контроля 1 и 2 соответственно. Таким образом, регионарное применение культивированных ММСК человека при компрессионной травме увеличивает силу мышечного сокращения и ускоряет функциональное восстановление мышечной ткани.

**Дергачева Т.И.<sup>1</sup>, Шурлыгина А.В.<sup>1</sup>,  
Мельникова Е.В.<sup>2</sup>, Грицык О.Б.<sup>2</sup>,  
Тендитник М.В.<sup>2</sup>, Королева Е.Г.<sup>1</sup>,  
Повещенко О.В.<sup>1</sup>, Коненков В.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины [anna\\_v\\_s@mail.ru](mailto:anna_v_s@mail.ru)

#### **ХАРАКТЕРИСТИКА ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ САМОК КРЫС ВИСТАР ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ**

Воспалительные заболевания органов малого таза занимают первое место в структуре акушерской и гинекологической патологии. Воспалительный процесс сопровождается количественными и качественными изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов очага воспаления и органов иммунной системы. Терапия с использованием ММСК (мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток) рассматривается как перспективное направление в лечении различных заболеваний. ММСК обладают низкой иммуногенностью, способностью модулировать воспалительные реакции и иммунные функции, в связи с чем могут быть использованы в лечении хронических воспалительных заболеваний. Цель данного исследования – изучить влияние различных способов введения костномозговых ММСК и КС (кондиционной среды) от костномозго-

вых ММСК на клеточный состав органов иммунной системы при экспериментальном хроническом воспалении внутренних половых органов у самок крыс Вистар. При хроническом воспалении отмечено изменение клеточного состава органов иммунной системы, свидетельствующее о развитии системной иммунной реакции по клеточному типу и об изменении дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе. Отмечено снижение содержания естественных и индуцибельных Т-регуляторных клеток (Трег) в тимусе и селезенке, что может быть фактором, поддерживающим хроническое воспаление, и способствовать запуску аутоиммунных механизмов, поражающих репродуктивные органы женщин при хроническом воспалении. Иммуномодулирующий и противовоспалительный эффект ММСК зависел от способа введения клеточного материала. И внутривенное, и лимфотропное введение оказывали иммуносупрессивное действие, но только лимфотропное введение ММСК вызывало изменения в лейкоцитарной формуле крови, свидетельствующие о снижении активности воспалительного процесса. Также, лимфотропное введение уменьшало число моноцитов-макрофагов/дендритных клеток в селезенке, не влияло на количество индуцибельных Трег и в меньшей степени снижало количество натуральных Трег. И внутривенное, и лимфотропное введение КС оказало аналогичное ММСК действие на клеточный состав органов иммунной системы. Оба способа привели к снижению содержания Трег в селезенке и в тимусе. Изменения в лейкоцитарной формуле крови отсутствовали, что свидетельствует о более слабом противовоспалительном эффекте КС. Вероятно, это объясняется быстрым выведением иммуномодулирующих факторов, входящих в состав КС от культуры ММСК. Результаты позволяют заключить, что одним из основных механизмов действия биомедицинского клеточного продукта в использованной экспериментальной модели может быть влияние на Т-регуляторные клетки, принимающие участие в развитии хронического воспаления. Наиболее выраженный противовоспалительный эффект оказывает лимфотропное введение ММСК, позволяющее создать повышенную концентрацию и длительную персистенцию продуцируемых данными клетками противовоспалительных факторов в ткани очага воспаления.

Финансирование исследования: *Бюджет*.

**Шурлыгина И.А., Аюшинова Н.И.,  
Чепурных Е.Е., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б.,  
Шурыгин М.Г.**

Иркутский научный центр хирургии и травматологии  
[irinashurygina@gmail.com](mailto:irinashurygina@gmail.com)

#### **МАР-КИНАЗЫ В УПРАВЛЕНИИ РЕПАРАТИВНЫМ ПРОЦЕССОМ**

В настоящее время распространённость патологий, при которой избыточный рост соединительной ткани является одним из основных факторов патогенеза, неуклонно возрастает. Соответственно возрастают и потребности медицины в новых методах и способах управления морфогенезом при данных заболеваниях. Однако каких-либо значимых успехов в этой области за многие годы так и не было достигнуто. В ИНЦХТ стартовал проект поиска принципиально новых подходов к лечению группы заболе-

ваний, характеризующихся повышенным развитием соединительной ткани. В рамках фундаментального раздела исследований определялась динамика активности сигнальных каскадов в клетках из очага формирования патологического разрастания соединительной ткани. На основании этого определялись возможные мишени и временные точки, на которые было необходимо оказать воздействие [1–3]. Наибольших успехов удалось достичь в исследовании такой патологии, как спаечный процесс в серозных полостях. Впервые были получены данные, свидетельствующие о двухволновом процессе активации спайкообразования, причем вторая волна вследствие большого временного промежутка от момента инициации спайкообразования в доступной литературе не описана и ранее не учитывалась при разработке средств для профилактики данного осложнения полостной хирургии. Исследователям удалось определить возможные мишени для угнетения спайкообразования, которыми стали белки каскада p38 MAPK, и очертить требования, которым должно отвечать кандидатное лекарственное средство для успешного подавления спайкообразования при минимизации побочных эффектов. В результате реализации программы исследований появилось инновационное лекарственное средство СЕРОГАРД®, являющееся заявкой на референсный препарат для профилактики спаек, с очень высокой эффективностью по результатам доклинических исследований [4].

#### Литература:

1. Шурьгина И.А., Шурьгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста// Сибирский медицинский журнал.- 2009. Т. 89, № 6.- С. 36-40.
2. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Granina G.B., Zelenin N.V. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase// Frontiers of Chemical Science and Engineering. 2012. Vol. 6. N 2. P. 232-237.
3. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Granina G.B., Zelenin N.V., Ayushinova N.I. Using laser confocal microscopy to assess the activity of map kinase systems in the reparative process// Bul. Russian Academy of Sciences: Physics.- 2016.- V. 80, N 1.- P. 14-16.
4. Shurygin M.G., Shurygina I.A. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process: Patent WO2012156938.

Финансирование исследования: *Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту 0543-2014-0003.*

#### **Щелкунова Е.И., Воропаева А.А.**

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России  
elena-shelkunova@mail.ru

#### **IN VITRO МОДЕЛЬ ОСТЕОАРТРОЗА КАК БИМЕДИЦИНСКИЙ КЛЕТочный ПРОДУКТ**

Остеоартроз (ОА) — распространенное заболевание коленных суставов, невоспалительного дегенеративного характера, которое затрагивает все компоненты сустава и связано с локальной потерей хрящевой ткани с течением времени и нарастающим болевым синдромом. Развитие остеоартроза у лиц молодого и среднего трудоспособного возраста представляет социально-экономическую проблему и требует поиска новых и эффективных методов его

консервативного лечения. ОА является существенной причиной ухудшения благосостояния и экономической составляющей у затронутых лиц и групп населения и одной из ведущих причин инвалидности во всем мире. Для разработки новых методов и лекарственных препаратов, применяемых при консервативном лечении ОА используют *in vivo* и *in vitro* модели. С целью снижения количества дорогостоящих доклинических испытаний на животных, а также соблюдения этических норм, разрабатываются математические и клеточные *in vitro* модели, позволяющие получать быстрый и точный результат исследования. *In vitro* модели ОА являются жизненно важными для продвижения исследований причин заболевания, исследования механизмов действия на клетки и развития новых стратегий терапии в разработке и последующего тестирования потенциальных терапевтических препаратов. Однако на сегодняшний день не существует адекватных *in vitro* моделей данного заболевания. ОА представляет собой многофакторное расстройство, и нет единого установленного этиологического механизма, общего для всех форм заболевания. При развитии ОА возникает варусная деформация, которая влечет за собой значительное перераспределение и увеличение биомеханической нагрузки на хрящевую ткань в области медиального мыщелка большеберцовой кости. Таким образом, возникают разные топографические зоны. Это дает основание предполагать, что в различных зонах коленного сустава, испытывающих неодинаковую механическую нагрузку, хондроциты отличаются активностью метаболических процессов, что может проявляться в изменениях синтеза количества и типов протеогликанов и коллагена. На основе монослойной культуры разрабатывается *in vitro* модель остеоартроза, представленная 3-мя клеточными линиями хондроцитов, выделенных из отличных по биомеханической нагрузке топографических зон суставного хряща 3-й стадии ОА. Благодаря этому, на примере данной *in vitro* модели ОА при тестировании лекарственных препаратов можно будет оценить эффект его воздействия на хрящевую ткань разных по степени повреждения участков сустава. Разрабатываемая *in vitro* модель может быть использована в области фармации, а также в области экспериментальной травматологии, ортопедии и регенеративной медицины в качестве основы для разработки аутологичного биомедицинского клеточного продукта.

Финансирование исследования: *Фонд содействия инновациям № 5616ГУ1/2014 от 05.05.2015 (код 0009179), конкурс УМНИК 1-14-12.*

**Юдинцева Н.М.<sup>1</sup>, Нащеккина Ю.А.<sup>1</sup>,  
Боголюбова И.О.<sup>1</sup>, Боголюбов Д.С.<sup>1</sup>,  
Воронкина И.В.<sup>1</sup>, Смагина Л.В.<sup>1</sup>,  
Блинова М.И.<sup>1</sup>, Муравьев А.Н.<sup>2</sup>,  
Орлова Н.В.<sup>2</sup>, Шевцов М.А.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН

<sup>2</sup> ФГБУ «Санкт-Петербургский

научно-исследовательский институт  
фтизиопульмонологии» Минздрава России

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России  
yudintceva@mail.ru

### **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ IN VITRO И ИХ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO**

В настоящее время активно развивается одно из направлений регенеративной медицины — клеточная терапия. Для того чтобы проследить дальнейшую судьбу введенных в организм клеток используют как прижизненные красители, так и активно применяемые в последнее время наночастицы. Благодаря присутствию им характеристикам, наночастицы могут быть обнаружены посредством соответствующих методов визуализации живых объектов при высоком пространственном и временном разрешении. Эти свойства позволяют отделить имплантированные клетки от клеток-хозяев и выполнять неинвазивное отслеживание помеченных клеток в реальном времени в условиях *in vivo*. Однако, несмотря на многочисленные исследования, вопрос о влиянии наночастиц на свойства клеток по-прежнему остается открытым. Цель работы: исследование влияния суперпарамагнитных наночастиц оксида железа на свойства клеток в условиях *in vitro*, а также выявление клеток, содержащих наночастицы, в условиях *in vivo* с использованием различных способов визуализации. В работе использованы мезенхимные клетки костного мозга кролика (МСК). Эффективность включения наночастиц клетками проанализирована на различных сроках инкубации с использованием метода иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии. С использованием метода трансмиссионной электронной микроскопии выполнен анализ ультраструктурной организации клеток, функционального состояния ядерных и цитоплазматических структур. Используя систему прижизненного наблюдения (IncuCyteZoom) проанализированы цитотоксичность, характер миграции и пролиферации клеток. Оценка уровня синтеза клетками белков внеклеточного матрикса (ВКМ) и характера его реорганизации с помощью матриксных металлопротеиназ (ММП) выполнена с применением белкового электрофореза и зимографии. В качестве контроля использовали клетки, не содержащие наночастицы. МСК, содержащие наночастицы, использовали для восстановления повреждений мочевого пузыря (МП) и его фиброзных изменений, вызванных *M. tuberculosis*. Прижизненную визуализацию клеток в условиях *in vivo* выполняли с помощью метода МРТ. После выведения животных из эксперимента были приготовлены и проанализированы криосрезы биоптатов ткани. Полученные результаты показали, что в условиях *in vitro* включение наночастиц не оказывало цитотоксического воздействия на клетки и не

влияло на ультраструктурную организацию, функциональное состояние ядерных и цитоплазматических структур. Однако получено некоторое влияние на характер миграции и пролиферации клеток. Кроме того, клетки, содержащие наночастицы, более интенсивно синтезировали и реорганизовывали белки ВКМ по сравнению с контролем. С помощью метода МРТ была показана интеграция скаффолда с клетками, содержащими наночастицы, с нативной тканью МП. При исследовании криосрезов помеченные частицами клетки обнаружены в эпителиальном и мышечном слоях МП. Иммуногистохимические исследования выявили клетки в разных слоях МП и частичную дифференцировку в клетки уротелия.

Финансирование исследования: Грант РНФ № 14-50-00068.

**Тюрин-Кузьмин П.А., Фадеева Ю.И.,  
Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Ткачук В.А.**

Факультет фундаментальной медицины

МГУ им. М.В. Ломоносова

tyurinkuzmin.p@gmail.com

### **РЕГУЛЯЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК К КАТЕХОЛАМИНАМ**

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) представляют собой крайне перспективный инструмент для регенеративной медицины, поскольку они способны дифференцироваться в клетки костной ткани, хряща, жира, мышц, а также обладают сильным регуляторным воздействием на процессы репарации и регенерации тканей и модулируют воспаление. Функциональная активность МСК подвержена строгому нейро-эндокринному контролю. Гормоны регулируют как дифференцировку, так и секреторную активность МСК. Изучая гормональную регуляцию МСК на уровне одиночных клеток, мы обнаружили, что на конкретный гормон отвечают лишь небольшие субпопуляции клеток, и группы клеток, чувствительные к отдельным гормонам, практически не пересекаются. При этом подавляющее большинство клеток популяции экспрессируют на своей поверхности одновременно рецепторы нескольких гормонов (Kotova et al., 2014, Tyurin-Kuzmin et al., 2016). В данной работе мы изучали регуляцию гормональной чувствительности МСК на примере одного из ключевых регуляторов функциональной активности этих клеток, гормона и нейромедиатора норадреналина. Мы обнаружили, что действие на МСК норадреналина наряду со снижением чувствительности (десенситизацией) и интернализацией бета-адренорецепторов приводит к гетерологичной десенситизации альфа1А-адренергических рецепторов. Гетерологичная десенситизация альфа1А-адренергических рецепторов связана с тем, что стимуляция бета-адренорецепторов и активируемой ими аденилатциклазы приводит к дополнительному синтезу белков альфа1А-адренергических рецепторов и их выходу на поверхность клеток. Как следствие, повышается чувствительность МСК к норадреналину и увеличивается число отвечающих на этот гормон клеток. Наблюдаемый эффект носит транзиторийный характер: чувствительность клеток достигает максимума через 6 ч. после стимуляции клеток и возвращается к базальному уровню через 24 ч. Кроме того, мы показали, что серотонин и дофамин тоже могут повышать чувствительность МСК к норадре-

налину. Таким образом, мы обнаружили уникальный механизм регуляции гормональной чувствительности МСК. Феномен сенситизации клеток в ответ на действие лиганда самого рецептора до сих пор был показан почти исключительно для эмбрионального развития организма в процессе формирования нервной системы. Выяснение механизмов регуляции МСК взрослого организма, помимо большого фундаментального значения для понимания механизмов поддержания гомеостаза тканей, крайне важно для контролируемого и прогнозируемого использования этих клеток в регенеративной медицине.

Финансирование исследования: *исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 14-15-00439.*

**Литвинова Л.С.<sup>1</sup>, Шуплецова В.В.<sup>1</sup>, Юрова К.А.<sup>1</sup>, Хазиахматова О.Г.<sup>1</sup>, Мелашенко Е.С.<sup>1</sup>, Хлусова М.Ю.<sup>2</sup>, Шаркеев Ю.П.<sup>3,4</sup>, Комарова Е.Г.<sup>4</sup>, Седельникова М.Б.<sup>4</sup>, Хлусов И.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет

<sup>3</sup> Томский политехнический университет

<sup>4</sup> Институт физики прочности и материаловедения СО РАН  
larisalitvinova@yandex.ru

#### **ОЦЕНКА СЕКРЕТОРНОЙ РЕАКЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ДВУМЕРНЫХ (2D) И ТРЕХМЕРНЫХ (3D) КУЛЬТУРАХ**

Сокультивирование ММСК с 3D-матриком, имитирующим структуру костной ткани, позволяет прогнозировать его поведение на межфазной границе раздела «искусственный материал/клетки и ткани», где происходит реализация общебиологических процессов (пролиферация, дифференцировка, созревание и функциональная активность клеток), в целях оценки эффективности репаративной регенерации в условиях остеосинтеза. Вариации секреции цитокинов в ответ на изменение условий культивирования может быть маркером изменения состояния стволовых клеток.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Культуры клеток, моделирующие очаги репарации костной ткани, создавали с применением ММСК жировой ткани (ЖТ), полученными из липоаспирата человека (Zuk P.A. et al., 2001) и адгезированными на экспериментальные образцы (10×10×1 мм<sup>3</sup>) из коммерчески чистого титана, несущего рельефное микродуговое двустороннее КФ-покрытие с индексом шероховатости (Ra) от 2 до 5 мкм (ИФПМ СО РАН, г. Томск). ММСК-ЖТ (5×10<sup>4</sup> кл/лунку) культивировали 14 сут. при 37°C, 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub> в присутствии матрикса (3D-культуры) в 12-луночных планшетах с добавлением 1,5 мл стандартной питательной среды на основе DMEM/F12 (1:1) (Gibco, USA). В качестве контроля использовали 2D-культуры ММСК-ЖТ на пластике. Анализ поверхностных маркеров на ММСК-ЖТ проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (MiltenyiBiotec, Germany) с использованием набора MSC PhenotypingKithuman (MiltenyiBiotec, USA); количественное определение медиаторов в супернатантах исследуемых культур клеток проводилось на автоматизирован-

ном анализаторе (Bio-PlexProteinAssaySystem, Bio-Rad, USA) с использованием тест-систем Bio-PlexProHumanCytokineStandard 21-Plex («Bio-Rad», USA). Статистическую обработку осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Жизнеспособность клеток составила в среднем 91% в контрольных 2D-культурах и 87% в исследуемых 3D-культурах. На 14 сут. в стандартной среде в условиях 2D культивирования 99% клеток несли маркеры ММСК (CD73, CD90, CD105) (Dominici M. et al., 2006), 1% – лейкоцитарные антигены (CD45, CD34, CD14 и CD20). При контакте ММСК-ЖТ с 3D-матриком снижалось число CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> клеток, содержание клеток с гемопозитическими детерминантами повышалось более чем в 2 раза. В целом, матрикса незначительно влияли на секрецию цитокинов в сравнении с контрольной культурой ММСК-ЖТ. Отмечено преимущественное увеличение в межклеточной среде уровня IL-18 и хемокинов (CTACK, GRO $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , SCF).

Мы предполагаем, что трехмерный матрикс с кальцийфосфатным покрытием способствует *in vitro* дифференцировке ММСК-ЖТ в остеобласты и образованию «остеобластных ниш» (Zhang J. et al., 2003), которые приводят к увеличению числа гемопозитических клеток, изначально присутствующих в первичной культуре ММСК (Taichman R.S., 2005). Фактор роста стволовых клеток (SCF) и стромально-го происхождения (SDF-1 $\alpha$ ) являются гуморальными компонентами кроветворной ниши и могут быть посредниками обнаруженного эффекта кальцийфосфатных матрикса.

Финансирование исследования: *исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 16-15-10031, сравнительный анализ результатов культивирования клеток) и РФФИ (№ 15-03-07659, изготовление и тестирование физико-химических свойств трехмерных матрикса для культивирования клеток).*

**Шевела Е.Я., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Шипунов М.В., Желтова О.И., Меледина И.В., Хван Л.А., Лепина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А.**

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»  
st\_lab@mail.ru

#### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

**ЦЕЛЬ.** Исследовали безопасность и эффективность трансплантации аутологичных костномозговых клеток в комплексном лечении 158 пациентов с хроническими гепатитами и циррозом печени (ЦП).

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Пациенты получали внутривенные инфузии костномозговых мононуклеарных клеток (МНК) с последующим введением через 14 дней генерированных мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Эффективность оценивали через 12 мес. после однократного введения клеток по изменению тяжести ЦП (по Child-Pugh). Кроме того, исследовали спонтанную и стимулированную липополисахаридом (ЛПС) продукцию 26 цитокинов клетками периферической крови методом BioPlex анализа.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Позитивный ответ в виде снижения тяжести ЦП или стабилизации процесса наблюдался в 70% случаев. Эффективность терапии была

максимальной у пациентов с ЦП класса А (83%) и В (79%). У пациентов с ЦП класса С позитивный ответ отмечался в 42,5% случаев. Повторные ультразвуковые исследования, проведенные через три года наблюдения у 39 пациентов, не выявили очаговых образований и эктопической оссификации.

По сравнению с донорами больные ЦП отличались статистически значимо повышенной исходной продукцией IL-9, MIP-1 $\beta$  и IP-10, а также отчетливой тенденцией к повышению TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , Rantes и Eotaxin. При этом клетки крови больных ЦП отличались ЛПС-реактивностью: продукция 11/26 цитокинов в ответ на ЛПС значимо превышала нормативные значения. Трансплантация костномозговых МНК оказывала минимальное влияние на продукцию цитокинов. В то же время введение МСК приводило к достоверному дозозависимому снижению спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции 20 и 18 из 26 анализов, соответственно. Супрессивный эффект МСК на продукцию цитокинов наиболее ярко проявлялся у пациентов с декомпенсированным ЦП вирусной этиологии.

**ВЫВОДЫ.** Трансплантация аутологичных клеток костного мозга является безопасным и эффективным подходом в лечении ЦП. Введение МСК ассоциируется с нормализацией цитокин-секреторной функции циркулирующих клеток крови у больных ЦП.

**Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Старостина Н.М.,  
Морозов С.А., Давыдова М.Н.,  
Останин А.А.**

*ФГБНУ «НИИ фундаментальной  
и клинической иммунологии»  
ct\_lab@mail.ru*

#### **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МАКРОФАГОВ В РЕАБИЛИТАЦИИ ПАЦИЕНТОВ С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ИНСУЛЬТОМ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Участие иммунной системы в регуляции нейрорепаративных процессов во многом опосредуется М2 макрофагами, которые обладают

иммуномодулирующей активностью и способны усиливать нейрогенез и нейропластичность.

**ЦЕЛЬЮ** настоящей работы явилась оценка безопасности и эффективности аутологичных М2 клеток у пациентов с церебральным инсультом в неостром периоде и анализ взаимосвязи цитокин-секреторной активности клеток крови с тяжестью инсульта и ответом на терапию.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Исследуемая группа включала 13 человек с ишемическим (n = 10) и геморрагическим (n = 3) инсультом. Среднее количество вводимых интратекально клеток составило  $21,9 \times 10^6$ . Контрольная группа, включающая также 13 пациентов, была сформирована по принципу «случай-контроль».

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Интратекальное введение клеток характеризовалось хорошей переносимостью и не вызвало развития тяжелых нежелательных явлений. Один пациент из исследуемой группы и двое пациентов из контрольной группы умерли в период 6-месячного наблюдения вследствие повторного инсульта. На период завершения 6-месячного наблюдения тяжесть неврологических расстройств по шкале NIHSS в исследуемой группе снизилась с 11 до 6 баллов (p = 0,007), в то время как в контрольной группе — с 11 до 8 баллов (p = 0,07). Отчетливый клинический эффект (улучшение NIHSS  $\geq 3$ ) в исследуемой группе наблюдалось у 75% против 18% в контрольной группе (pТМФ = 0,03). Уровень продукции IL-8, IL-10 и IL-4 перед началом лечения коррелировал с тяжестью инсульта. Пациенты, ответившие на терапию, отличались от пациентов оппоритной группы более низкой спонтанной продукцией IL-10 и ростовых факторов — FGF- $\beta$ , PDGF, VEGF, наряду с более высокой Кона-стимулированной продукцией провоспалительных цитокинов — IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-6.

**ВЫВОДЫ.** Интратекальное введение М2 макрофагов пациентам, перенесшим инсульт, безопасно и приводит к более эффективному неврологическому восстановлению, которое может быть обусловлено иммуномодулирующей активностью макрофагов.



ИНСТИТУТ  
СТВОЛОВЫХ  
К Л Е Т О К  
ЧЕЛОВЕКА



ПАО «ИСКЧ» (Институт Стволовых Клеток Человека) – российская многопрофильная биотехнологическая компания, основанная в 2003 году.

Направления деятельности ИСКЧ – научные исследования, разработка, а также коммерциализация и дальнейшее продвижение на рынке собственных инновационных лекарственных препаратов и высокотехнологичных медицинских услуг.

Компания ставит целью формирование новой культуры медицинской заботы о человеке – развитие здравоохранения в области персонализированной и профилактической медицины.

### Проекты ИСКЧ охватывают следующие сегменты современных биомедицинских технологий:



генная терапия



регенеративная  
медицина (клеточные  
сервисы и препараты,  
тканеинженерные  
продукты)



медицинская генетика,  
в т.ч. репродуктивная  
(генетическая  
диагностика  
и консультирование)



биострахование



биофармацевтика  
(в рамках  
международного  
проекта «СинБио»)

ИСКЧ принадлежит банк персонального хранения стволовых клеток пуповинной крови Гемабанк® - крупнейший в РФ и СНГ, а также банк репродуктивных клеток человека – Репробанк® (персональное хранение и донация).

Компания вывела на рынок первый российский геннотерапевтический препарат для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза – Неоваскулген®, а также инновационную медицинскую технологию применения дермальных аутофибробластов для восстановления кожи с признаками возрастных и иных структурных изменений – SPRS-терапия®.

ИСКЧ реализует социально-значимый проект по развитию лаборатории и сети медико-генетических центров Genetico® для предоставления услуг гене-

тической диагностики и консультирования с целью раннего выявления и профилактики наследственных заболеваний, а также патологий с генетической составляющей (включая преимплантационную генетическую диагностику, неинвазивное пренатальное тестирование, а также сервисы в области онкогенетики и биоинформатики на основе NGS /расшифровка генома человека и его интерпретация, диагностические панели на отдельные категории и случаи заболеваний/).

Компания развивает свои продукты и услуги как на российском, так и на международном рынке.

ИСКЧ – первая публичная биотехнологическая компания в России, эмитент сектора РИИ Московской Биржи (тикер: ISKJ).



[www.hsci.ru](http://www.hsci.ru)



+7 (495) 646-80-76





[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)