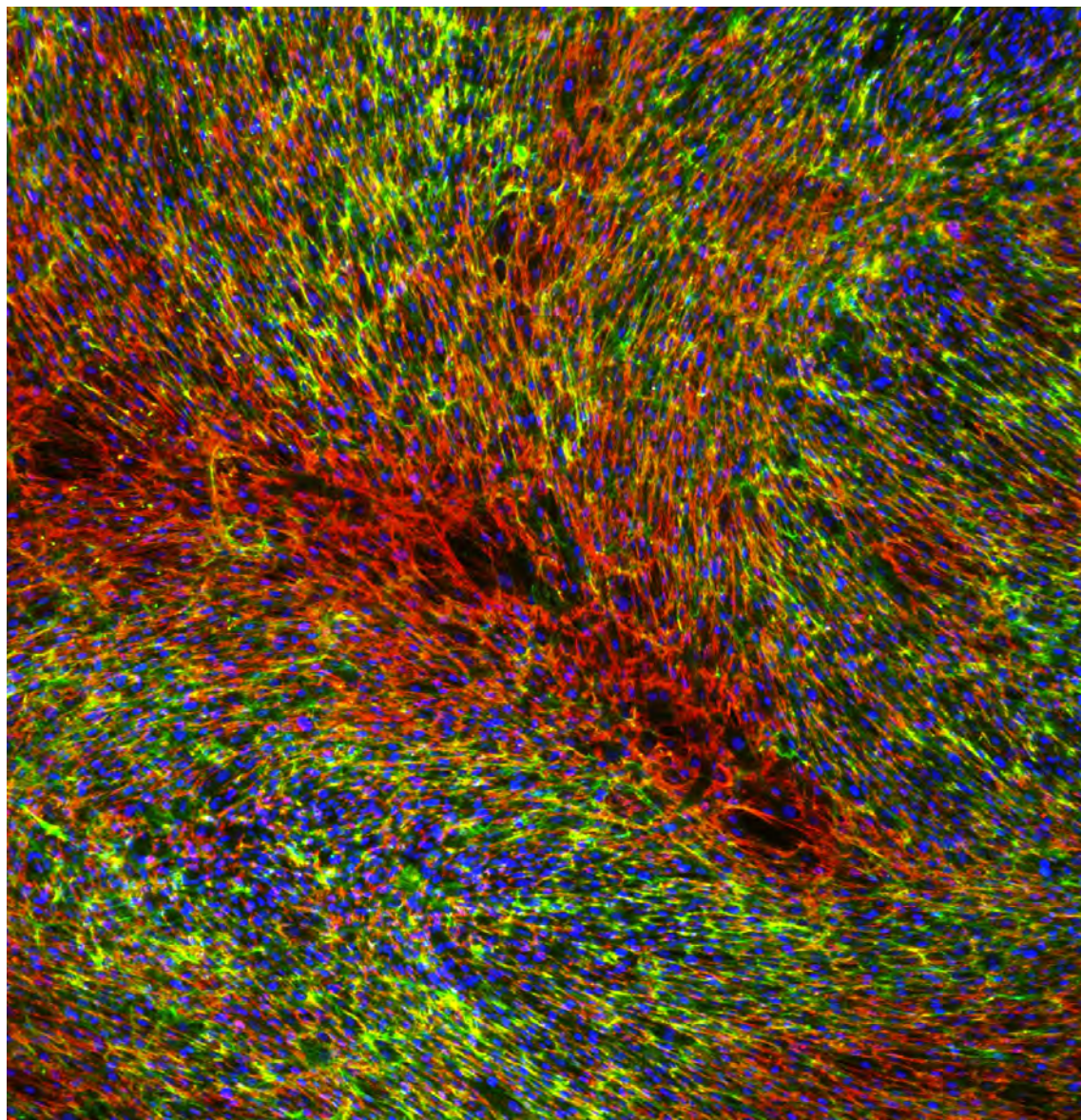


ISSN 2313-1829

Том XIV, Приложение, 2019

Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**МАТЕРИАЛЫ IV НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА
ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Москва, 20–23 ноября 2019 года

www.genescells.ru

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

Genes & Cells

Vol. XIV, Приложение, 2019

© Human Stem Cells Institute, 2019

Гены & Клетки

Том XIV, Приложение, 2019

Журнал рекомендован ВАК Министерства образования
и науки РФ для публикации основных научных
результатов диссертаций на соискание
ученой степени доктора и кандидата наук

Журнал включен в российские и международные
библиографические и реферативные базы данных:
eLIBRARY (www.elibrary.ru), Scopus (www.scopus.com)

EDITORIAL COUNCIL

Editor-in-Chief

R.V. Deev
Human Stem Cells Institute (Moscow)
I.I. Mechnikov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

Executive Editor

I.Y. Bozo
Histografit, LLC (Moscow)
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

Editorial Board:

B.V. Afanasiev
I.P. Pavlov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

V.S. Akatov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.P. Baklaushev
Federal Scientific and Clinical Center, FMBA of Russia (Moscow)

A.S. Bryukhovetsky
State Medical University of Russia (Moscow)

R.K. Chailakhian
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Moscow)

I.A. Chekmareva
A.V. Vishnevskiy Institute of Surgery (Moscow)

V.S. Chirsky
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

G.D. Dalgatov
Federal Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology FMBA of Russia (Moscow)

M.I. Davydov
Medsi, LLC (Moscow)

A.A. Doctorov
Research and Training Center of Biomedical Technologies RRIMAP of RAAS (Moscow)

P.A. Dyban
Scientific Research Institute of Experimental Medicine, (Saint-Petersburg)

V.G. Gololobov
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

Y.P. Gribunov
Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center of the Business Administration for the President of the Russian Federation (Moscow)

A.A. Gumerova
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

R.E. Kalinin
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.P. Kiasov
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

S.L. Kiselev
N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS (Moscow)

K.V. Kotenko
Corresponding member of the RAS (Moscow)

V.A. Kozlov
Research Institute of Clinical Immunology (Novosibirsk)

A. Kuliev
Florida International University (Miami, USA)

A.V. Kulikov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.S. Komlev
A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS (Moscow)

Editorial Board:

A.V. Bersenev (San Francisco, USA)
A.G. Chogovadze (Moscow)
A.Y. Efimenko (Moscow)
I.I. Eremin (Moscow)
G. Feichtinger (Leeds, United Kingdom)
M.S. Fominyh (Saint-Petersburg)
A.S. Grigoryan (Saint-Petersburg)
P.V. Kruglyakov (Saint-Petersburg)
P.I. Makarevich (Moscow)
Ch.M. Nasadyuk (Lviv, Ukraine)
I.V. Potapov (Moscow)
V.S. Sergeev (Saint-Petersburg)
R.G. Vasiliev (Kiev, Ukraine)
N.V. Tsupkina (Saint-Petersburg)

A.A. Maschan
D. Rogachev Federal Scientific and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow)

S.A. Matveev
N.I. Pirogov National Medical-Surgical Center (Moscow)

G.L. Mentkevich
N.N. Blokhin Institute of Children's Oncology (Moscow)

Sh.M. Mitalipov
Oregon Health and Science University (Beaverton, USA)

B.B. Moroz
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

I.A. Odintsova
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

N.A. Onishchenko
V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs (Moscow)

O.V. Paklina
S.P. Botkin City Clinical Hospital (Moscow)

Ye.V. Parfyonova
Moscow State University (Moscow)

A.S. Pavliuk
Research Institute of Eye Diseases (Moscow)

Yu.A. Petrenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine (Kharkov, UA)

A.G. Popandopulo
V. Gusak Institute Emergency and Reconstructionist Surgery (Donetsk)

A.V. Prikhodko
Gemabank (Moscow)

S.A. Rumyantsev
N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow)

S.V. Sazonov
Ural State Medical University (Ekaterinburg)

N.S. Sergeeva
P.A. Herzen Moscow Oncological Research Institute (Moscow)

E.I. Shishatskaya
Institute of Biophysics SB RAS (Krasnoyarsk)

E.V. Skorobogatova
Russian clinical children hospital (Moscow)

I.A. Suchkov
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.N. Tomilin
Institute of Cytology of RAS (Saint-Petersburg)

V.V. Tsymborg
«Biovitrum» Co. Ltd. (Moscow)

S.E. Voskanyan
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

S.M. Zakian
Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk)

V.L. Zorin
Human Stem Cells Institute (Moscow)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Главный редактор

Р.В. Деев
Институт стволовых клеток человека (Москва)
Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова

Ответственный редактор

И.Я. Бозо
ООО «Гистографт» (Москва)
Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

Участники редакционного совета:

В.С. Акатов

Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН (Пушино, Московская обл.)

Б.В. Афанасьев

Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург)

В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

А.С. Брюховецкий

Российский государственный медицинский университет (Москва)

С.Э. Восканян

Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

В.Г. Гололобов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Ю.П. Грибунов

Центральная клиническая больница с поликлиникой
Управления делами президента РФ (Москва)

А.А. Гумерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

М.И. Давыдов

ООО «Медси» (Москва)

Г.Д. Далгатов

Федеральный научно-клинический центр
оториноларингологии ФМБА России (Москва)

А.А. Докторов

Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

П.А. Дыбан

Научно-исследовательский институт экспериментальной
медицины (Санкт-Петербург)

С.М. Закиян

Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)

В.Л. Зорин

Институт стволовых клеток человека (Москва)

Р.Е. Калинин

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.П. Киясов

Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

С.Л. Киселев

Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова (Москва)

К.В. Котенко

Член-корреспондент РАН (Москва)

В.А. Козлов

НИИ клинической иммунологии (Новосибирск)

А. Кулиев

Международный университет Флориды (Майами, США)

А.В. Куликов

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино)

В.С. Комлев

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (Москва)

Адрес редакции:

119333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373
Тел./факс: +7 (495) 734-91-70
E-mail: redaktor@celltranspl.ru

Присылать материал для публикации, ознакомиться
с правилами для авторов, оформить подписку можно
в Интернете по адресу: www.genescells.ru
+7(495) 646-80-76

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору
за соблюдением законодательства в сфере массовых
коммуникаций и охране культурного наследия

Свидетельство о регистрации

ПИ № 77 – 57156 от 11.03.2014 г.

ISSN 2313-1829

Редакционная коллегия:

А.В. Берсенев (Сан-Франциско, США)
Р.Г. Васильев (Киев, Украина)
А.С. Григорян (Санкт-Петербург)
И.И. Еремин (Москва)
А.Ю. Ефименко (Москва)
П.В. Кругляков (Санкт-Петербург)
П.И. Макаревич (Москва)
К.М. Насадюк (Львов, Украина)
И.В. Потапов (Москва)
В.С. Сергеев (Санкт-Петербург)
Г. Файштингер (Лидс, Великобритания)
М.С. Фоминых (Санкт-Петербург)
Н.В. Цупкина (Санкт-Петербург)
А.Г. Чоговадзе (Москва)

А.А. Масчан

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (Москва)

С.А. Матвеев

Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова (Москва)

Г.Л. Менткевич

НИИ детской онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва)

Ш.М. Миталипов

Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

Б.Б. Мороз

Федеральный медицинский биофизический центр им.
А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

И.А. Одинцова

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Н.А. Онищенко

Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных
органов им. академика В.И. Шумакова (Москва)

А.С. Павлюк

Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

О.В. Паклина

Городская клиническая больница им. С.П. Боткина (Москва)

Е.В. Парфенова

Московский государственный университет (Москва)

Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины (Харьков, Украина)

А.Г. Попандопуло

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (Донецк)

А.В. Приходько

Гемабанк (Москва)

С.А. Румянцев

Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

С.В. Сазонов

Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург)

Н.С. Сергеева

Московский научно-исследовательский онкологический
институт им. П.А. Герцена (Москва)

Е.В. Скоробогатова

Российская детская клиническая больница (Москва)

И.А. Сучков

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.Н. Томилин

Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)

Р.К. Чайлахян

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)

И.А. Чекмарева,

Институт хирургии им. А.В. Вишневского (Москва)

В.С. Чирский

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

В.В. Цимберг

ООО «БиоВитрум» (Москва)

Е.И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Электронная версия журнала www.genescells.ru

ISSN электронной версии: 2500-2562

Свидетельство о регистрации

Эл №ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И.А. Яковлев

Верстка С.А. Климентовский

Подписано в печать 30.10.2019. Формат бумаги 60×84/8.

Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,5.

Тираж 100 экз. Заказ № 2599.

Отпечатано в типографии Book Jet, 390005, г. Рязань, ул. Пушкина,
д. 18, тел.: +7 (4912) 466-151, www.bookjet.ru

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся
в настоящем издании, допускается с письменного разрешения
редакции. Ссылка на журнал «Гены и клетки» обязательна.



**Александр Александрович Максимов
(1874–1928)**

Александр Александрович Максимов — великий отечественный гистолог и патоморфолог, доктор медицины, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель кафедры гистологии и эмбриологии Императорской Военно-медицинской академии.

А.А. Максимов родился в Санкт-Петербурге, в 1896 году окончил Императорскую военно-медицинскую академию лучшим из выпускников. С 1903 года избран руководителем кафедры гистологии и эмбриологии. С 1922 года А.А. Максимов покинул СССР и начал работу в качестве профессора кафедры анатомии и возглавил работу лаборатории экспериментального исследования тканей в Чикагском университете.

А.А. Максимов заложил теоретические и экспериментальные основы современной науки о клетках и тканях, их структурной организации. Используя метод изучения переходных форм, он получил экспериментально-научное обоснование унитарной теории кроветворения и установил, что все клетки крови развиваются из одного предшественника.

А.А. Максимов впервые в отечественной науке использовал термин «стволовая клетка», первым высказал

мнение о существовании в дефинитивных тканях клеток-предшественниц для соединительных тканей.

В своих работах Александр Александрович впервые использовал метод тканевых культур, который и сейчас имеет огромное значение для экспериментальной гистологии. Максимов подробно описал этот метод и охарактеризовал морфологию основных клеток соединительной ткани в культуре.

Труды А.А. Максимова заложили основу современной клеточной биологии и регенеративной медицины не только в России, но и во всём мире. По словам В. Блюма, ученика Александра Александровича, «...независимо от того, что принесёт будущее в области изучения крови и соединительной ткани, ...наблюдения Максимова, которые были сделаны на высочайшем экспериментально-гистологическом уровне, всё равно будут иметь значение. Они будут представлять основу для дальнейших разработок по вопросам нормальной и патологической гистологии, гистогенезу крови и соединительной ткани, области, которую он сделал такой интересной».



Владимир Петрович Демихов (1916–1998)

Владимир Петрович Демихов — физиолог, доктор наук, основоположник современной трансплантологии.

Родившись в крестьянской семье, он в 1934 году поступил в Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова на физиологическое отделение биологического факультета и очень рано начал научную деятельность. В 1937 году, будучи студентом-третьекурсником, он сконструировал и собственными руками изготовил первое в мире искусственное сердце, а затем вживил его собаке, которая после этого прожила два часа.

В 1940 году В.П. Демихов окончил университет, написал первую научную работу. Начавшаяся война прервала научные поиски. С 1941 по 1945 гг. В.П. Демихов служил в действующей армии — выполнял обязанности врача-патологоанатома.

С 1945 года работал на базе Института экспериментальной и клинической хирургии, 1955 до 1960 — в Первом Московском медицинском институте им. И.М. Сеченова.

В 1946 году В.П. Демихов впервые в мире успешно подсадил собаке второе сердце, а вскоре он смог провести пересадку сердца и легкого одновременно. Это был настоящий прорыв в мировой хирургии. Он первым

отработал метод коронарного шунтирования, а также впервые разработал метод сохранения жизненно важных органов в функционирующем состоянии до семи суток путем их подключения к кровеносной системе живого организма. В его лаборатории разрабатывались методы пересадки головы, печени, надпочечников с почкой, пищевода, конечностей. После таких операции животные жили несколько дней, недель и даже месяцев. Это доказывало возможность проведения подобной операции у человека.

В 1960 году В.П. Демихов издал монографию «Пересадка жизненно важных органов в эксперименте», которая стала первым в мире руководством по трансплантологии и долгие годы оставалась единственным.

Работы Владимира Петровича получили международное признание. В его лаборатории стажировались хирурги из США, Германии, ЮАР и Австралии. «Доктор Демихов — один из величайших экспериментаторов мира, технологиями которого до сегодняшнего дня пользуются все клиники мира, занимающиеся пересадками сердца, печени, почек, легких» — так сказал о Владимире Петровиче Демихове знаменитый кардиохирург Р.С. Акчурин.



Александр Яковлевич Фриденштейн (1924–1997)

Александр Яковлевич Фриденштейн — выдающийся гистолог, основатель и заведующий лабораторией иммуноморфологии в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, профессор, член-корреспондент Академии медицинских наук СССР.

Родился в Киеве, в 1928 году вместе с семьей переехал в Москву. Окончил Московский медицинский институт МЗ РСФСР в 1946 г. В 1950 г. А.Я. Фриденштейн защитил кандидатскую, а в 1960 году — докторскую диссертацию по специальности «гистология». В 1963 г. Александром Яковлевичем Фриденштейном была организована лаборатория иммуноморфологии, которую он возглавлял более 25 лет.

Александр Яковлевич впервые описал и экспериментально подтвердил существование в костном мозге и лимфоидных органах стволовых стромальных клеток, которые сегодня известны всему миру как мультипотентные мезенхимные стромальные клетки. Ими было показано, что фрагменты костного мозга *in vivo* способны формировать кость или костномозговой орган. Было впервые установлено, что формирование кроветворного

органа на месте трансплантации фрагмента костного мозга обеспечивается приживлением стромальных костномозговых клеток, а именно популяцией клеток, которые способны дифференцироваться, образуя костную, хрящевую, фиброзную, а также жировую ткани.

А.Я. Фриденштейн и его сотрудники показали, что стромальные клетки костного мозга способны к длительному самоподдерживанию и являются самостоятельной, независимой от кроветворной, линией клеток. Полученные им данные впервые позволили сформулировать понятие о стволовых стромальных клетках кроветворной и лимфоидной тканей.

Последующие годы в творческой жизни Александра Яковлевича были посвящены изучению именно стволовых клеток кроветворной ткани. Метод избирательного клонирования костного мозга человека, разработанный А.Я. Фриденштейном, был использован не только во многих гематологических клиниках для изучения состояния стромальной ткани при различных гематологических нарушениях, но и при оказании гематологической помощи пострадавшим во время аварии на Чернобыльской АЭС.



Иосиф Львович Чертков (1927–2009)

Иосиф Львович Чертков — выдающийся гематолог, исследователь-экспериментатор, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Гематологического научного центра РАМН.

Иосиф Львович родился в 1927 году в Одессе. В 1947 он окончил лечебный факультет Первого Московского медицинского института. С 1956 года работал в Гематологическом научном центре РАМН, сначала в качестве старшего научного сотрудника, затем в качестве заведующего лабораторией до 1996 года и с 1997 в качестве главного научного сотрудника.

И.Л. Чертковым опубликован цикл приоритетных работ «Стволовые кроветворная и мезенхимная клетки». Им внесен большой вклад в изучение клональности кроветворения и установления, что стволовые кроветворные клетки (СКК) обладают высоким, но не безграничным пролиферативным потенциалом; они не бессмертны и не могут «самоподдерживаться». СКК закладываются только в эмбриогенезе и расходуются последовательно, образуя короткоживущие, локально расположенные, сменяющие друг друга клеточные клоны, аналогично тому, как это происходит в яичнике.

Иосиф Львович также показал, что стволовые мезенхимные клетки (МСК) родоначальники кроветворного микроокружения отличаются от СКК по радиочувствительности. При внутривенной трансплантации костного мозга в виде клеточной взвеси МСК теряются — они не способны проникнуть в микрообласти, где происходит их функционирование, даже в случае, если костномозговая взвесь вводится внутрь кости.

В работах И.Л. Черткова впервые были получены цитофизиологические характеристики МСК и принципиальные данные о клональной кинетике СКК. Полученные данные нашли подтверждение в мировой практике. Показано, что при внутривенной трансплантации костного мозга донорские МСК не выживают, выявлены клоны «здоровых» СКК у больных с гематопролиферативными заболеваниями, данные о клональности кроветворения подтвердились в исследованиях печального опыта Чернобыльской аварии. Иосиф Львович создал также ряд диагностических препаратов на основе моноклональных антител для определения групп крови. Эти препараты широко используются и сейчас.

И.Л. Чертковым опубликовано 4 монографии и более 300 статей в отечественных и зарубежных журналах.



Леонид Иванович Корочкин (1935–1996)

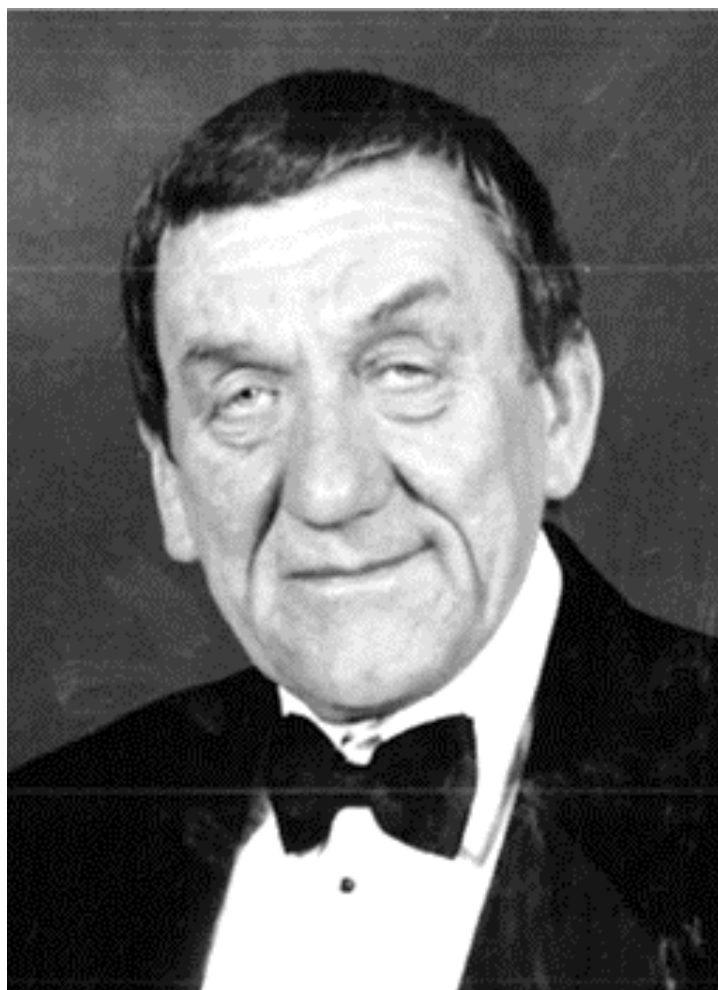
Леонид Иванович Корочкин — выдающийся российский генетик и нейробиолог, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной биологии в Институте биологии развития РАН, заведующий лабораторией нейрогенетики и генетики развития в Институте биологии гена РАН.

Леонид Иванович занимался исследованиями процессов нейрогенеза. Вот лишь некоторые из его достижений:

- используя новаторские подходы, он выявил нейронные ансамбли в сплетениях автономной нервной системы и сформулировал «групповой принцип» развития и функционирования нейронов;
- разработал принципы гистохимического тестирования функциональной активности нейронов, которые до сих пор используются в нейрогистологии и патогистологии;
- был основателем в СССР направления науки генетики изоферментов;
- разработал технику молекулярного анализа синтеза РНК в отдельной клетке;
- разработал методы изоляции отдельных клеток и микрометоды их молекулярно-генетического анализа;
- впервые показал наличие нейробластического резерва в интрамуральной нервной системе желудка и его участие в этих процессах;
- исследовал генетическую регуляцию тканеспецифического синтеза белка у дрозофилы, что привело к выделению гена эстеразы и выявлению архитектуры генетической системы, связанной с регуляцией полового поведения.

Л.И. Корочкин также выполнил ряд пионерских работ в области изучения стволовых клеток. В частности, он показал, что стволовая и прогениторные клетки обладают пластичностью в выборе пути дифференцировки. Леонид Иванович одним из первых предложил использовать аутогенные стволовые клетки, опасаясь туморогенности клеточного материала из других источников. Л.И. Корочкин разработал новую методику получения трансгенных клеток, содержащих нейротрофические факторы, для трансплантации при нейродегенеративных заболеваниях.

Л.И. Корочкин — автор около 500 научных публикаций в отечественной и зарубежной печати, нескольких монографий и учебников. Его работы широко известны в нашей стране и за рубежом. Заслуги Леонида Ивановича были отмечены Государственной премией РФ и Премией имени Н.К. Кольцова.



**Вадим Сергеевич Репин
(1936–2018)**

Вадим Сергеевич Репин — выдающийся биохимик, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заведующий лабораторией микрохимии Института экспериментальной медицины АМН СССР, заведующий лабораторией культуры клеток и тканей Института экспериментальной кардиологии Всесоюзного Кардиологического научного центра АМН СССР, главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии РАМН».

В.С. Репин прошел большой и серьезный путь в науке, и вся его деятельность была напрямую связана с разработкой способов помощи больным. С 1964 по 1977 гг. в созданной им лаборатории микрохимии он проводил биохимические исследования единичных яйцеклеток, ранних зародышей лабораторных грызунов, биохимии оплодотворения. Уделял много внимания разработке методов микрохимии и методов получения первичных клеточных культур и органов человека. По приглашению академика Е.И. Чазова Вадим Сергеевич в 1977 году переехал в Москву, создал пионерскую лабораторию культуры клеток и тканей, где оригинальными методами были получены культуры различных клеток сосудистой

стенки, печени, кишечного эпителия человека для изучения клеточных и биохимических механизмов атеросклероза и нарушений липидного и липопротеидного обмена.

С 1997 по 2000 гг. Вадим Сергеевич работал заместителем директора по науке Института биологической медицины при Центре акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, с 2000 по 2004 — научным консультантом ЗАО «РеМеТекс».

В последнее десятилетие Репин трудился в Институте общей патологии и патофизиологии, став вдохновителем создания и научным руководителем лаборатории клеточной биологии и патологии развития. Основой научных интересов Вадима Сергеевича стало изучение стволовых клеток человека и применение их в медицине; медицинская клеточная биология и биотехнология; клеточные механизмы атеросклероза; клеточные механизмы цирроза и других заболеваний печени. Вадим Сергеевич стоял у истоков фундаментальных исследований возможностей применения стволовых и прогениторных клеток при различных заболеваниях, в том числе считающихся неизлечимыми.

Плодотворная научная деятельность Вадима Сергеевича получила высокое международное признание.



**Николай Петрович Омеляненко
(1950–2018)**

Николай Петрович Омеляненко — выдающийся ученый-гистолог, непревзойденный специалист по соединительной ткани, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией электронной микроскопии ЦИТО им. Н.Н. Приорова, заведующий лабораторией соединительной ткани с группой клинической генетики ЦИТО им. Н.Н. Приорова. Лауреат премии Ленинского комсомола, лауреат премии Правительства Российской Федерации.

Николай Петрович в 1973 году окончил Первый Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. С 1973 по 1986 год работал в должности научного сотрудника в НИЛ биологических структур Минздрава СССР.

Н.П. Омеляненко опубликовал более 200 работ в области гистофизиологии соединительной ткани, в том числе 7 монографий. Он является соавтором трех практических руководств для врачей.

Николай Петрович был членом Нью-Йоркской Академии наук, международных обществ: «Соединительная ткань», «Заживление ран», «Ортопедов и травматологов», «Российской ассоциации морфологов». Под

его руководством подготовлена плеяда специалистов в области гистологии соединительной ткани, остеологии, клинической и экспериментальной морфологии, электронной микроскопии.

Николай Петрович — неутомимый труженик и исследователь, посвятивший всю свою жизнь без остатка любимому делу — советской и российской науке. В основу своего труда он положил главную цель: наука ради помощи пациенту, исследователю, врачу. Много лет Николай Петрович посвятил изучению клеточных основ регенеративной медицины, разрабатывал и реализовывал на практике новые биотехнологические способы ускорения заживления сложных повреждений скелета, исправлению врожденных деформаций костей у детей, восстановлению морфо-функциональной организации скелетных тканей после травм.

Своими мыслями, словами и делами, реализовавшимися в научных исследованиях, профессор Н.П. Омеляненко внес основополагающий вклад в развитие фундаментальных знаний о строении соединительной ткани в норме и патологии.

МАТЕРИАЛЫ IV НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

МОСКВА, 20–23 НОЯБРЯ 2019 г.

Технические редакторы: Е.В. Тарасова, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко, Н.Н. Шаталова, Р.В. Деев.

Мероприятие проводится при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №19-015-20046\19)

MECHANICAL DISSOCIATION OR ENZYMATIC DIGESTION FOR THE ISOLATION OF NEURAL STEM CELLS FOR THERAPEUTIC USE

Joseph Allen¹, Nikolai Nikolaevich Didenko²

¹ School of Pharmacy, University of Reading, Reading, United Kingdom;

² Stem Cell Lab, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation;

j.c.allen@student.reading.ac.uk

Introduction. Periodontitis affects >743 million people worldwide. Neural crest-derived stem cells (NC-SCs) hold the required multipotentiality to regenerate the damaged periodontium. These cells have been identified within adult tissue samples of adipose tissue, PDL and palatal tissue, reducing ethical problems associated with stem cell use. Typical enzyme isolation protocols are expensive, time consuming and may represent increased patient risk. Mechanical dissociation has been suggested as a method of generating cell suspensions required for stem cell isolation and proliferation.

Material and methods. Samples of skeletal muscle tissue were used to appraise the suitability of a novel mincing method of mechanical dissociation against enzymatic digestion with collagenase and dispase. Skeletal muscle is readily available and has shown to contain populations of NCSCs.

We used the Rigenera-Human Brain Wave[®] prototype mincer to produce a healthy suspension of NC stem cells. We have compared successful cell cultures produced via mechanical dissociation and enzymatic dissociation, producing single cell suspensions suitable for Magnetic Active Cell Sorting (MACs) with human antigen marker CD271.

Results. Despite Countess Automated Cytometry data identifying cell suspensions produced by mechanical dissociation (n=24) containing on average 26,8 times as many living cells as enzymatic cell suspensions (n=18), enzymatic suspensions produced more successful cell cultures. Spheroids and subsequent adherent cells formed from 4 enzymatic cell suspensions (44,4%) vs. 1 mechanical cell suspension (8.3%). Additionally, enzymatic digestion protocols formed spheroids faster and more plentifully than mechanical cell suspensions. Adherent cells and spheroids isolated via both methods appear morphologically similarly to NC-SCs from our previous studies.

Conclusion. The results of this study have indicated the suitability of this prototype mincer for prospective experiments with palatal tissue. Although proliferative cultures of adherent cells were isolated using mechanical dissociation, this mechanical dissociation method does not represent a viable alternative to enzymatic digestion, suitable for use in the clinical setting.

ADULT NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS (NCSCS) FOR COMPARATIVE RESEARCH

Natella Enukashvily¹, Julia Dombrovskaya², Anna Malashicheva¹, Daria Semenova¹, Anastasia Kotova^{1,2}, Varvara Bagaeva², Wolf-Dieter Grimm^{2,3}, Darius Widera⁴, Irina Masiennikova², Dmitry Ivogin²

¹ Institute of Cytology, St. Petersburg, Russia;

² North-Western Medical University, St. Petersburg, Russia;

³ Witten/Herdecke University, Witten, Germany;

⁴ University of Reading, Reading, UK

nie@newmail.ru

Adult craniofacial tissues in vertebrates contain post-migratory neural crest-derived stem cells (NCSCs). These cells, originated from ectoderma, undergo an epithelial-mesenchymal transition in embryogenesis, while keeping their multipotency. The optimal source of NCSC is the tissues of the oral cavity — alveolar and palatine mucous membranes, dental pulp, periodontal ligaments, etc. In each tissue, stem cells (SC) are located in different microenvironment that affects their properties. NCSC from the oral cavity of standard laboratory rodents differ from human SC. We hypothesized that the ovine palate contains NCSCs with a developmental potential equivalent to their human counterparts.

Objective: to investigate the morphofunctional properties of NCSC from the oral cavity of human and sheep.

The study was carried out using primary cultures of dental pulp SC (DPSC) and SC from human exfoliated deciduous teeth (SHED), as well as SC of human periodontal ligaments (PDLSC) and SC of the sheep hard palate mucosa. Cells were isolated both by adhesion to plastic and by immunomagnetic separation. The proliferative activity and immunophenotype of the populations were determined. To study the features of osteogenic differentiation, we compared the intensity of staining with alizarin, the timing of calcifications and transcription of the late and early response osteogenic genes (*POSTN*, *OSX*, *ALP*, *Cbfa1*, *BGLAP*), as well as odontoblast markers (dentinocalcin, *DSPP*; Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 precursor — *DMP-1*). The ability of the isolated cells to form neurospheres was evaluated.

Human PDLSC had the maximum proliferative activity, DPSC proliferated at a slower rate. The cells of all samples possessed had surface markers of mesenchymal stromal cells. However up to 20% of cell at early (2–3) passages were positive for CD117+. Pulp SCs (DPSC) were the fastest responding to osteogenic stimuli; in this case, odontoblast marker genes were transcribed at a higher level as compared to PDLSC. Sheep NCSC proliferated at a rate comparable to human PDLSC. Both human SC and sheep SC were capable of forming neurospheres and expressing NCSC markers (e.g. HNK-1, Slug, CD271).

Thus, despite the fact that the properties of NCSC depend on their niche, sheep NCSC have properties similar to human cells and can be used as a model object in pre-clinical studies of the efficacy and safety of cellular products based on NCSC.

SKIN ORGANOIDS AS A NOVEL TOOL FOR ANALYSIS OF THE SKIN MICROENVIRONMENT *IN VITRO*

Anastasiya Gorkun¹⁻³, Adam Jorgensen¹, Caterina Grasso¹, Naresh Mahajan¹, Mingsong Wu¹, Shay Soker¹, Anthony Atala¹

¹ Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Winston Salem, USA;

² FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation;

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Moscow, Russian Federation

stgork@gmail.com

Introduction. Skin has a complex layered structure designed to provide the first physical and immunologic barrier from the aggressive influence of environment. *In vitro* models containing native skin architecture include cell sheets-derived skin and bioprinted skin. However, these models show low viability in long-term *in vitro* studies (more than 14 days), require complex bioreactors for culture, and do not allow for non-invasive, real-time microscopy due to sample thickness. To overcome these limitations, we have generated a novel skin organoid containing the key cell types present in skin as a tool for disease modeling and drug testing *in vitro*.

Materials and Methods. Multiple human skin cell types were induced to form spheroids at varying cellular concentrations. Cell viability in the organoids was determined using Live/Dead assay and skin structures were assessed by histology, immunohistochemistry and scanning electron microscopy (SEM) at 7, 14 and 21 days of culture *in vitro*. Cell-specific markers have been used to specify a location of different cells: Pan-Cytokeratin, G-Mel, Cytokeratin 71, CD146, Vimentin, and Adiponectin.

Results. The skin organoids formed compact structures with high cell viability maintained up to 21 days. The skin organoids' layered organization was confirmed using SEM, Hematoxylin and Eosin (H&E) staining and Masson's Trichrome staining. Immunohistochemical staining showed that the surface of the epidermis was formed by keratinocytes and melanocytes and the center representing the dermal core was formed by fibroblasts, follicle dermal papillae cells, microvascular endothelial cells and adipocytes. The epidermal zone was stratified, organoids were uniformly pigmented, and the dermal core increased collagen deposition by 21 days.

Conclusions. By utilizing cellular self-organization, we have created skin organoids containing the major skin cell types which localized with layer specificity to recreate the normal skin microenvironment. Thus, our novel skin organoids recapitulate normal human skin microanatomy and functional characteristics, and provide an efficient and cost effective *in vitro* model of human skin for a wide range of investigations.

SECRETOME OF STEM CELLS AS AN ALTERNATIVE TO STEM CELL TRANSPLANTATION

Wolf-Dieter Grimm¹⁻³, Dariusz Widera^{2,4}

¹ Department of Dentistry, Faculty of Health, Witten/Herdecke University, Witten, Germany

² Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation,

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

⁴ Reading School of Pharmacy, University of Reading, Reading, UK

prof_wolf.grimm@yahoo.de

Recent advances in stem cell biology and regenerative medicine raised hopes for future routine use of stem cells in restoration of tissue and organ function in various diseases and disorders.

Oral-derived neural crest related stem cells (oNCSCs) have drawn attention in recent years because of their accessibility, plasticity, and high proliferative ability. The oNCSCs can undergo self-renewal and have multipotent differentiation ability, but do not have the ethical issues associated with other sources of stem cells. The tissue engineering methodologies combined with an increased understanding of oNCSCs biology will provide powerful tools for a wider spectrum of application of oNCSCs in various therapeutic strategies. Emerging evidence suggests that adult craniofacial tissues in vertebrates contain limited numbers of post-migratory neural crest-derived stem cells.

Globally, the advances using oNCSCs in therapeutic, reconstructive, and orthopedic applications are the future of personalized and regenerative medicine. However, because oNCSCs technology is still in its infancy, interdisciplinary cooperation is needed to achieve successful clinical applications. Despite the unquestioned therapeutic benefit of stem cell transplantation, numerous studies have reported that the potential of adult stem cells to improve regeneration and healing of chronic wounds is mediated largely through their immunomodulatory, anti-inflammatory and angiogenic properties rather than being a result of engraftment and differentiation.

Recent lines of evidence suggest that stem cell-derived extracellular vesicles (EVs) harbour an anti-inflammatory, angiogenic and immunomodulatory potential that is comparable to ADSCs themselves without the associated risks. NCSCs possess immunomodulatory and immunosuppressive properties that are mainly mediated through secretion of extracellular vesicles (EVs). Notably both, the content (a specific combination of different proteins, lipids, microRNAs as well as a small portion of mRNAs) and immunomodulatory features of EVs are cell type and context-dependent. In general, wound healing models in animal models represent a potent tool in regenerative medicine and allow quantitative measurement of regeneration by assessing the bone defect healing. Such quantitative parameters would greatly facilitate the evaluation of the effects of NCSC-derived EVs on wound (bone defect) healing.

TREATMENT OF DIABETIC PERIPHERAL ARTERY DISEASE WITH AUTOLOGOUS BONE MARROW OR PERIPHERAL BLOOD DERIVED CELLS

Tatyana Isaeva^{1,2}, Maria Surovceva¹, Irina Kim¹, Mihail Smagin¹, Rustam Hapaev¹, Vadim Nimaev^{1,2}

¹ *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

phmshonok@mail.ru

Diabetic foot syndrome occurs in 10,0% of cases among patients with diabetes mellitus, ulcers heal too long, are accompanied by infectious processes and occurs gradually leading to the amputation of the affected limb. Some authors suggest, that the paracrine factors secreted by mononuclear stem cells (MNCs) are these the main driving force behind its therapeutic activity. In the current study, we investigate the efficacy and safety of the therapy of ischemia using stem cells in patients with diabetes mellitus. An assessment of the paracrine functionality of the patient's cells was performed.

There were three groups: the patients from the main group were treated with intramuscular injections of mobilized autologous mononuclear cells (12) or bone marrow autologous cells (5). The patients of the control group (20) had similar conservative and endovascular treatment within the same time period without stem cells. We analyzed cell types, level of cell proliferation and viability, promising effects of MNCs conditioned medias on proliferation of lines fibroblasts, MSCs from patients without diabetes mellitus and EaHy926, migration on the wound model.

The tolerance of patients to cell therapy is high, the number and volume of surgical interventions on the foot after cell therapy are less, epithelialization of trophic ulcers and restoration of the support function of the limb are higher in the main group. There is a patient-specific correlation between the composition of the cellular product, conditioned media and their clinical effect. We suggest that MNCs conditioned medias can be employed in regenerative medicine for therapeutic angiogenesis and skin repair in difficult-to-heal conditions such as diabetic foot.

STIMULATING EFFECT OF FS-1 ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOPOIESIS AND MYELOPOIESIS PROGENITOR CELLS IN VITRO

Samal Kassymbekova¹, Tamara Bukeyeva¹, Indira Bishimova¹, Sholpan Tursunova¹, Sabina Murzageldinova¹, Tigran Davtyan²

¹ *Scientific Centre for Anti-infectious Drugs, Almaty, Kazakhstan;*

² *Analytical Laboratory, Scientific Centre of Drug and Medical Technology Expertise JSC, Yerevan, Republic of Armenia*

s_kassymbekova@scaid.kz

Cancer is the second leading cause of death globally, and is responsible for an estimated 9,6 million deaths in 2018. Chemotherapy is a cancer treatment that uses drugs to kill rapidly growing and dividing cells, like cancer cells. Unlike radiation or surgery, which target specific areas, chemo works

systemically. This affects some fast-growing healthy cells, like those of the skin, hair, intestines, and bone marrow.

Bone marrow is the spongy tissue inside the bones, which makes new blood cells. Chemotherapy affects this process, so there are side effects, such as too few blood cells. Low levels of blood cells during treatment can cause problems: more susceptible to infections; body tissues do not receive enough oxygen (hypoxia); anemia and increased blood coagulation.

Prevention and treatment of such side effects is called palliative or supportive therapy and constitutes an important part in cancer treatment.

In this article we present study results concerning new medicine FS-1 effect on bone marrow mesenchymal stem cells. FS-1 synthesized at Scientific Centre for Anti-infectious Drugs is ionic nanostructured complex formed by proteins and/or polypeptides, hydrocarbons, salts of alkali and alkaline earth metals with intercalated iodine. Patented in 2014 (RK No20129000).

In our work we used mesenchymal stem cells from mouse bone marrow (STEMCELLS Technologies, USA). Detect production of stem-cells factor (SCF), IL-7, IL-8 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), chemotactic stroma-derived factor-1 (SDF-1), macrophage anti-inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β quantitative analysis was made using kits from R&D Systems (USA) in accordance with manufacturers' protocols.

In the process of study of FS-1 effect on production of cytokines and chemokines in mouse bone marrow mesenchymal stem cells culture we found out that FS-1 has actual stimulating effect on production of SCF (P = 0,015), IL-7 (P = 0,017), M-CSF (P = 0,009) and SDF-1 (P = 0,009).

Thus, new medicine FS-1 can influence animal bone marrow by stimulating mouse bone marrow mesenchymal stem cells to produce certain cytokines regulating myelopoiesis and lymphopoiesis, as well as certain chemokines taking part in induction of stem cells and mature cells migration from bone marrow to blood.

Obtained results can be used in development of drugs for bone marrow hematopoietic function recovery during chemotherapy of tumors.

IMPROVING CRISPR-CAS TECHNOLOGY FOR THERAPEUTIC APPLICATIONS

Nataliya A. Logvina¹, Ilya P. Kopnin¹, Ilya O. Aparin¹, Timofei S. Zatsepin^{1,2}

¹ *Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia;*

² *Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

n.logvina@skoltech.ru

CRISPR-Cas technology has rapidly become a popular and rather powerful tool of genome manipulation. It is widely used not only for scientific research but for the development of new therapeutic approaches.

Applications of CRISPR-CAS system are not limited by genome editing, they include genetic screens, modulation of gene expression either by attracting RNA polymerase or by blocking its binding to DNA, induction of histone or genome methylation and silencing, incorporation of specific sequences into the target site in the genome.

Whatever modification of the CRISPR-Cas technology is used, it relies deeply on the target recognition by CRISPR-Cas complex, based on the complementarity of a rather short oligonucleotide sequence. The efficiency and

specificity of this binding of spacer part of the guide RNA to DNA are especially important for therapeutic applications of CRISPR-Cas system. However, its selectivity is still insufficient for routine *in vivo* use. Uncontrolled insertion or removal of genes and their fragments in the “hot spots” of the genome can lead to oncotransformation of cells after genome editing *ex vivo* or *in vivo*. Another important problem for therapy is targeted delivery of the preformed RNA-protein complex or insufficient level of nuclear localization of synthetic guide RNAs if they are not part of the protein.

Here we use combinations of known and novel chemical RNA modifications to improve the characteristics of precise genome editing for its potential applications in biomedicine. These novel modifications stabilize RNA *in vivo* and are less toxic than phosphorothioates which are widely used to prevent RNA degradation of synthetic RNA molecules *in vivo*. We identify patterns of RNA modifications which can further improve therapeutic efficacy of CRISPR-Cas system without decrease of genome editing efficiency and compare them to the known gRNA modifications patterns. We also analyze the effects of these RNA modifications on the protein-RNA complex activity and discuss possible alterations in the structure of Cas9 effector complex caused by these modifications.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant № 19-04-00298.

TRANSLATIONAL 3D CELL CULTURE SYSTEMS FOR CLINICALLY COMPLIANT EXPANSION OF ADULT STEM CELLS AND ISOLATION OF STEM CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES

Darius Widera

University of Reading, United Kingdom

d.widera@reading.ac.uk

Since its early days, *ex vivo* mammalian cell culture has been conducted on flat two-dimensional (2D) glass or polystyrene surfaces. Although 2D cell culture is still widely used, it is known to result in unnatural cell polarity and morphology in addition to lacking the three-dimensional extracellular matrix. These drawbacks are especially evident if the cultivated cells are clinically relevant cell types including but not limited to stem cells. In this context, 2D cultivation is known to interfere with stem cell proliferation and to alter the cell phenotype.

In this talk, different approaches to stem cell cultivation, differentiation, and assessment of migration in 3D will be discussed. In particular, biocompatible natural and synthetic scaffolds for the cultivation of adult human neural crest-derived stem cells and human mesenchymal stem cells of different origin will be presented. Moreover, the impact of extracellular vesicles derived from adult human stem cells will be discussed in the context of their regenerative potential.

АНАЛИЗ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СОБАКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ ОПУХОЛИ И ГЕНЫ-ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ *IN VITRO*

Ильмира Ильдаровна Абдрахманова^{1,2}, Дарья Сергеевна Чулпанова¹, Владислав Моисеевич Чернов^{1,2}, Валерия Владимировна Соловьева¹, Елена Юрьевна Закирова¹, Альберт Анатольевич Ризванов¹

¹ *Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, Россия;*

² *ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия*

ilma25.94@mail.ru

Схожая патофизиология онкологических заболеваний собак и человека делает собак перспективной моделью для исследования эффективности противоопухолевой терапии. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) — негемопозитические клетки-предшественники, которые способны избирательно мигрировать в опухолевые ниши. Поэтому МСК могут быть использованы для целевой доставки противоопухолевых агентов. Одними из таких агентов могут быть цитокины — белки иммунной системы. Многочисленные исследования на клеточных культурах и животных моделях опухолей показали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью.

МСК были выделены из жировой ткани собаки. Выделенные клетки были в значительной степени положительны по поверхностным маркерам мезенхимных стволовых клеток собаки CD105, CD10, Stro-1 и Thy-1. Мультипотентность МСК была подтверждена путем дифференцировки в хондроциты, остеобласты и адипоциты. МСК были генетически модифицированы рекомбинантным лентивирусом, кодирующим родственный фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганд собаки (TRAIL), интерферон β -1 собаки (IFN β 1) и фосфатазу с двойной субстратной специфичностью собаки (PTEN). Полученную клеточную линию отбирали путем культивирования в среде с бластицидином S (5 мкг/мл) в течение 10 дней. Экспрессия генов была подтверждена ПЦР в режиме реального времени. Для того, чтобы оценить противоопухолевую активность нативных и генетически модифицированных МСК, 2×10^5 МСК культивировали в течение 24 часов, затем собирали кондиционированную среду (КС). Клетки рака толстой кишки человека HCT-116 культивировали в свежей среде RPMI-1640, либо в КС от нативных или генетически модифицированных МСК. Через 48 часов пролиферативная активность клеток HCT-116, культивировавшихся в КС генетически модифицированных МСК, была значительно ниже ($78,97 \pm 9,23\%$) по сравнению с клетками, культивировавшимися в КС нативных МСК ($99,71 \pm 4,38\%$) и в свежей среде ($100,00 \pm 4,36\%$).

В дальнейших экспериментах будет проанализирована противоопухолевая активность полученных МСК на модели спонтанного возникновения опухолей у собак крупных пород *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научно-го проекта № 18-44-160024 и Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

ДЕЙСТВИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ОПЕРАЦИОННОЙ РАНЫ У КРЫС

Заира Магомедовна Абдулатипова,
Ирина Евгеньевна Трубицына

ГБУЗ Московский клинический научный центр
им. А.С. Логина ДЗМ, Москва, Россия

z.abdulatipova@mknc.ru

Введение. Отсутствует ясность и понимание механизмов «качественного» и «некачественного» заживления. Вопросы регенерации и репарации тканей базируются на фундаментальных научных исследованиях молекулярной и клеточной биологии. В последние годы во всем мире стали активно изучать и применять клеточные технологии для индукции восстановительных процессов. Применение новых технологий может стать наиболее эффективным методом лечения.

Цель. Изучить механизмы повреждения и защиты, обусловленные БАС в слизистой оболочке желудка и периферической крови, их изменения при хирургических ранах желудка в эксперименте на разных этапах патологического процесса.

Материал и методы. Использовали 60 белых крыс линии Wistar. Создана модель послеоперационной раны желудка. Выполнено 2 серии опытов: с однократным и двукратным введением аллогенных МСК. Введение аллогенных МСК КМ, как и физиологического раствора, осуществляли внутрибрюшинно. В первой серии опытов клеточный препарат в дозе 3,5 млн. клеток вводили крысам однократно на 3 сутки после операции. Во второй серии опытов аллогенные МСК вводили крысам дважды на 3 сутки и на 6 сутки. Контроль – интактным одно- или двукратно вводили физиологического раствор.

Результаты и обсуждение. В группе контроля в 40% выявлена воспалительная реакция и расхождение швов. В серии исследований с однократным введением МСК на 3 сутки воспаление и расхождение шва было в 10% животных. В группе животных при двукратном введении осложнений не было. Для оценки цитокинового статуса в сыворотке крови животных определяли содержание про- (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) и противовоспалительных цитокинов (IL-4). Через 24 часа после ушивания операционной раны в сыворотке крови повышалась концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IFN γ). При низком содержании ротивовоспалительного интерлейкина (IL-4). После введения аллогенных МСК снижалось содержание TNF α , IL-1 β и IFN γ и повышался IL-4.

Заключение. Установлена положительная динамика регенераторных процессов в зоне операционной раны под влиянием МСК. Эти процессы связаны с позитивным иммунорегуляторным действием МСК. После введения МСК восстанавливается соотношение про- и противовоспалительных цитокинов и активируется морфогенетическая функция иммуноцитов. Отражением этих процессов является отсутствие поздних осложнений заживления операционной раны.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GFAP — СПЕЦИФИЧЕСКОГО МАРКЕРА АСТРОЦИТОВ

Александр Андреевич Авдеев¹, Елена Викторовна Григорьева¹⁻⁴, Софья Викторовна Павлова¹⁻³, Сергей Петрович Медведев¹⁻⁴, Анастасия Александровна Малахова¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

avdeev@bionet.nsc.ru

Исследование астроглиальных клеток представляет большой интерес при изучении процессов нейродегенерации и нейропластичности. Клетки астроглии выполняют важные функции в гомеостазе нейронов и регуляции синаптической пластичности, влияют на выброс проапоптотических факторов. Для изучения механизмов взаимодействия астроглии с нейронами *in vitro* важным условием является получение чистых популяций целевых типов клеток. Несовершенство протоколов дифференцировки ИПСК приводит к незначительному выходу релевантных типов клеток. Решением этой проблемы может стать отбор целевых клеток с использованием интегрированных в геном флуоресцентных репортеров, которые помогают осуществлять визуализацию экспрессии специфических генов-маркеров. Ранее нами была получена линия ИПСК, в которой репортерный ген *RFP* маркировал экспрессию астроцит-специфического гена *GFAP*. ОТ-ПЦР анализ выявил наличие РНК-продукта гена *RFP* в дифференцированных производных, однако свечение флуоресцентного белка не регистрировалось. Вероятно, это связано с низкой активностью промотора гена *GFAP*, недостаточной для визуализации свечения *RFP* при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. В настоящей работе проведена оптимизация системы визуализации экспрессии целевого гена. В локус *AAVS1* при помощи системы CRISPR/Cas9 внесли репортерную конструкцию *LoxP-GFP-LoxP-RFP* под контролем конститутивного промотора *Pgk1*. Непосредственно за маркерным геном *GFAP* через 2A-пептид помещена последовательность гена *Cre*-рекомбиназы. В отсутствие активности гена *GFAP* в клетках экспрессируется белок *GFP*. После активации *GFAP* в клетках нарабатывается *Cre*-рекомбиназа, обеспечивающая удаление последовательности гена *GFP* вместе со стоп-кодоном из генома. В результате активируется ген *RFP*, и клетки приобретают красное свечение. Активность репортерной системы подтверждена на клетках линии HEK293A, в геном которой внесли конструкцию *LoxP-GFP-LoxP-RFP*. Временная экспрессия *Cre*-рекомбиназы осуществлялась с плазмиды *pCAG-Cre:GFP* (Addgene #13776). Для подтверждения работы созданной нами системы визуализации необходима интеграция обоих трансгенов в геном ИПСК и проведение направленной дифференцировки. Система позволит выявить наличие астроглиальных производных в смешанной популяции дифференцированных клеток человека.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН 1.2.44 и бюджетным проектом 0259-2019-0002.

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У КРЫС ЛИНИИ SHR

Виктория Сергеевна Айдарова, Владислав Георгиевич Бабийчук, Иван Иванович Ломакин, Ольга Валентиновна Кудокоцева

Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины, Харьков, Украина

aidarova@karazin.ua

Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) позволяет оценить состояние и общую активность в организме человека и животных механизмов регуляции физиологических функций и его адаптационных резервов. Цель — изучить влияние последовательного применения краниocereбральной гипотермии (КЦГ) и криоконсервированных клеток пуповинной крови (кПК) на показатели ВСР у крыс линии SHR с генетически детерминированной АГ.

Объект исследования — 12-месячные крысы SHR, которым проводили сеанс КЦГ на аппарате «Флюидокраниотерм ПГВ-02», после чего внутривенно вводили суспензию кПК человека (5×10^8 клеток/кг). Регистрацию ЭКГ у животных осуществляли на 7 и 30 сутки после проведения КЦГ и введения кПК на электрокардиографе серии «Поли-Спектр» («Нейро-Софт», Россия) во 2-м стандартном отведении. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм».

Показано, что у крыс SHR отмечаются изменения вегетативного баланса, выражающиеся в низкой синхронизации регуляторных составляющих и возрастании симпатического звена, что свидетельствует о снижении уровня нейрогуморальной регуляции и наличии явлений перенапряжения и астенизации в регуляторных отделах ЦНС у животных с хронической формой АГ. Анализ характера изменений ВСР на 7 сутки после применения КЦГ и кПК позволил оценить последовательные воздействия как факторы, направленные на активацию адаптационно-компенсаторных процессов со сбалансированностью ваго-симпатических взаимоотношений и нейрогуморальных факторов регуляции. К 30 суткам после воздействий у крыс с АГ отмечалось снижение симпатикотонических влияний. Снижение значимости нейро-гуморальной составляющей в регуляции сердечного ритма сопровождалось сохранением преобладания вагусной составляющей (по соотношению общих значений и динамики изменений LF и HF). Таким образом, возможности адаптационно-компенсаторных реакций у крыс линии SHR после сочетанного применения КЦГ и кПК сохраняются на более высоком уровне, чем в группе контроля без воздействий.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕКМЕНТА ТРАХЕИ ПРИМАТОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТРАНСПЛАНТАТА

Андрей Леонидович Акопов¹, Гарри Вазгенович Папаян¹, Станислав Дмитриевич Горбунков¹, Д.Д. Карал-Оглы², П.А. Капланян², Сергей Владимирович Орлов², Елена Александровна Губарева³, Елена Вячеславовна Куведза³, Дарья Михайловна Кузнецова³

¹ *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;*

² *НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия;*

³ *Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия*

akopovand@mail.ru

Циркулярная резекция трахеи при удалении более 50% ее длины связана со значительными рисками развития осложнений и летальности. Путь к решению данной проблемы, возможно, лежит в создании тканеинженерной конструкции трахеи, которая может быть использована для замещения удаленного участка. Основной причиной неудач при трансплантации является потеря каркасной функции и недостаточное формирования эпителиальной выстилки на внутренней поверхности трахеи. Для предупреждения осложнений необходимо, как минимум, добиться ревазуляризации трансплантированного органа, с целью чего предложено производить предварительную гетеротопическую имплантацию донорского органа в хорошо васкуляризованные ткани реципиента. Обычным визуальным осмотром доказать наличие хорошей ревазуляризации трансплантата *in vivo* не удается. Эту задачу можно решить методом индоцианиновой ангиографии, основанной на системном вводе в кровотоки индоцианина зеленого, с последующим наблюдением зоны интереса в свете инфракрасной флуоресценции.

В эксперименте использовались донорские трахеи двух самцов павиана гамадрила. Децеллюляризацию обеих трахей проводили по единому протоколу с использованием детергент-энзиматического метода. В качестве реципиентов выбраны два здоровых павиана гамадрила. Проведена имплантация в участок широчайшей мышцы спины двух реципиентов (павианы гамадрилы) сегментов трахеи длиной 4 см до и после рецеллюляризации. Наличие ревазуляризации в трансплантате трахеи оценивали через 60 суток после операции с использованием индоцианиновой флуоресцентной ангиографии.

Через 60 суток после имплантации фрагменты трахеи обнаружены у обоих животных, хрящевой каркас макроскопически представлялся сохранным, плотно интегрированным в мышечную ткань, естественного цвета, однако мембранозная стенка трахеи и просвет трахеи отсутствовали. Методом индоцианиновой флуоресценции у обоих животных удалось визуализировать сосуды трахеи, а также четко различить межхрящевые сосуды и участки хрящевых полуколец, лишенные сосудов. Имплантированные сегменты практически равномерно васкуляризованы, локальных нарушений кровоснабжения не отмечалось.

Имплантация тканеинженерного комплекса трахеи, как подвергнутого рецеллюляризации, так и без нее, сопровождается включением трансплантированного сегмента трахеи в кровотоки через 60 суток после имплантации. Флуоресцентная ангиография является информативным методом оценки ревазуляризации трахеи приматов без эвтаназии животного.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛО-МАНИПУЛЯЦИОННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ

Диана Яковлевна Алейник, Игорь Юрьевич Арефьев, Ирина Николаевна Чарыкова, Людмила Николаевна Докукина, Юлия Павловна Рубцова, Татьяна Ивановна Сидорова

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

daleynik@yandex.ru

Ожоговая травма остается одним из самых тяжелых и распространенных видов травм, а ее лечение — сложным и высоко затратным. Одним из современных направлений в лечении ожогов стало использование мало манипуляционных клеточных технологий, основными преимуществами которых является использование только аутологичного клеточного материала, без этапов культивирования, без применения ксеногенных добавок и искусственных сред.

В университетской клинике «ПИМУ» Минздрава России разработана оригинальная технология лечения ожоговых ран на основе использования свежесывороточной клеточной взвеси. Используя метод лазерной проточной цитометрии (цитометр FACS CANTO ii) показано, что 75–90% клеток взвеси экспрессировали цитоцератин, от 7 до 20% были CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺ при минимальном количестве клеток крови (CD45⁺ до 4–5%). Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к панцитокератину и виментину после культивирования взвеси подтвердило ее клеточный состав. Жизнеспособность клеток взвеси — 60–80%.

В исследование были включены 109 детей и 39 взрослых в возрасте с ожогами 2–3 степени (в соответствии с МКБ-10). Все пациенты или их законные представители дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Этапы технологии: забор биоптата кожи, ферментативная холодовая обработка и получение клеточной взвеси, трансплантация аутологичных клеток в сочетании с фибриновым клеем на раневое ложе; у взрослых, при больших по площади поражениях (более 30% п.т.), вместе с сетчатым аутоотрансплантатом 1:6.

Наблюдение показало, что эпителизация раневой поверхности (в том числе и в ячейках трансплантатов) наступала в срок 6–14 дней с момента операции. Пациенты не отмечали дополнительного дискомфорта, связанного с локализацией примененной методики, по сравнению с классическими методами аутодермопластики. Не было инфекционных осложнений, реакций индивидуальной гиперчувствительности, объемного лизиса аутоотрансплантатов, замедленной эпителизации.

При катамнестическом наблюдении через 6–12 месяцев не фиксировали формирования грубых рубцов и функциональных нарушений в зонах применения метода. В результате: сокращено количество перевязок под наркозом, уменьшено время нахождения пациентов в стационаре, улучшено качество вновь образованной кожи. Технология не требовала специального оборудования и может выполняться в любом хирургическом стационаре после проведения ряда организационных мероприятий и кратковременного обучения специалистов.

БМКП ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОЖИ: ХАРАКТЕРИСТИКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Диана Яковлевна Алейник, Марфа Николаевна Егорихина, Ирина Николаевна Чарыкова, Юлия Павловна Рубцова, Лариса Николаевна Соснина, Андрей Александрович Стручков, Петр Владимирович Перетягин, Анна Геннадьевна Соловьева, Наталья Юрьевна Орлинская

Университетская клиника ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

daleynik@yandex.ru

Разработан БМКП для замещения дефектов кожи на основе естественных биополимеров и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани человека. МСК вводили в состав в процессе формирования БМКП и с помощью световой и фазово-контрастной микроскопии показали динамику и равномерное распределение их в структуре матрицы. В 1 сутки после формирования МСК были округлыми, начиная с 3 суток — «выбрасывали» отростки и «расправлялись». К 6 дню в структуре матрицы была сформирована «клеточная сеть» с множеством межклеточных контактов, и БМКП были готовы для использования. Все материалы и конструкторы были стерильны.

Для характеристики МСК в структуре БМКП выбрали методы, позволяющие оценить их без разрушения матрицы, избежать выраженной гибели и повреждения клеток. С помощью флуоресцентной микроскопии (красители Lipophilic Tracers-Dio и Hoechst 3334, цифровой имиджер Cyation5) показано сохранение МСК типичной морфологии и жизнеспособности. Количественный анализ (Патент РФ № 2 675 376) показал пролиферативную активность МСК в структуре конструктора. Изменение содержания VEGF-A в ростовой среде (метод ИФА) — выраженную секреторную активность. Для фенотипирования МСК выделяли из структуры БМКП с помощью коллагеназы. После выделения фиксировали снижение доли клеток CD90⁺ до 80%. Культивирование выделенных клеток на пластике привело к восстановлению фенотипа МСК.

Оценивали эффективность БМКП при восстановлении дефекта кожи на модели полнослойной кожной раны крыс с кольцом. При формировании БМКП в экспериментальных условиях использовали охарактеризованные МСК жировой ткани крысы. Сформировали три группы: 1 — с полнослойной кожной раной под увлажняющей повязкой; 2 — с полнослойной кожной раной со скаффолдом (матрицей) без клеток; 3 — с полнослойной кожной раной с БМКП. Состояние ран контролировали с помощью планиметрии, видеонаблюдения, дерматоскопии, гистологических и иммуногистохимических методов. Животных выводили из эксперимента на 7, 14, 21 и 28 сутки.

Продемонстрирована эффективность применения БМКП: отмечено раннее формирование грануляционной ткани, ускорение процессов ангиогенеза, образование и организация правильно упорядоченных коллагеновых и эластиновых волокон в подлежащей ткани, ускорение эпителизации.

ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК — ТРИГГЕР РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Мария Анатольевна Александрова

ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

mariaaleks@inbox.ru

Одна из задач регенеративной медицины — замена потерянных и поврежденных клеток для нервной ткани решается с использованием стволовых клеток или трансплантацией экзогенных клеток. Сейчас полагают, что новый подход, направленный на репрограммирование собственных эндогенных клеток может быть эффективным для регенерации в нервной ткани. У взрослых млекопитающих терминально дифференцированные нейроны не способны к самовосстановлению, в то время как глиа и другие не нервные клетки со свойствами латентных прогениторов реагируют на травмы регрессией исходной дифференцировки и даже репрограммированием или трансдифференцировкой до нового состояния дифференциации. К таким клеткам относят, повсеместно присутствующие в мозге астроциты, Мюллерову глию (МГ) и клетки пигментного эпителия (ПЭ) в сетчатке и Шванновские клетки (ШК) на периферии. Все они при повреждении сходным образом понижают уровень дифференцировки и пролиферируют, но достигают разной степени регресса. С фундаментальных позиций важно, что в ходе дедифференцировки клетки находятся в некотором промежуточном состоянии, одновременно экспрессируя гены маркеры и исходной и последующей дифференцировки, что отличает молекулярные механизмы регенерации клетки от нормального развития. В успешно регенерирующей периферической нервной системе ключевым регулятором ответа на травму нерва является *c-Jun*, который активирует гены эпителиально-мезенхимального перехода и стволового состояния в ШК. Дедифференцированные ШК используют другие формы поведения, экспрессируют нейротрофические, ростовые факторы и цитокины, отсутствующие во взрослой нервной ткани, что в сумме активирует и поддерживает регенерацию нерва. В ЦНС паренхимные астроциты дедифференцируются и выявляют стволовые свойства, клетки МГ и ПЭ в сетчатке транзитивно экспрессируют *OCT3/4*, *NANOG*, *KLF-4*, обнаруживая признаки плюрипотентности что, вероятно, допускает репрограммирование в нейроны. Тем не менее, регенерация в ЦНС почти не поддерживается, поэтому новый подход направлен на подбор факторов транскрипции, микроРНК, малых молекул, морфогенов и трофических факторов, которые усиливают *in vivo* в дедифференцированных клетках нейрогенез и регенерацию.

Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН 0108-2019-0004.

КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ РЕПАРАЦИИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

Ольга Игоревна Александрова¹, Кирилл Эдуардович Журенков¹, Галина Алексеевна Писугина¹, Юлия Игоревна Хорольская¹, Татьяна Вячеславовна Машель¹, Дарья Александровна Переплетчикова¹, Илья Олегович Гаврилюк², Анатолий Сергеевич Дубовиков², Анна Владимировна Безушко², Игорь Николаевич Околов³, Миральда Ивановна Блинова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

elga.aleks@gmail.com

Для целого ряда офтальмологических патологий в настоящее время не существует оптимальных патогенетически обусловленных методов лечения, что приводит к низкой эффективности терапии. Среди таких патологий важное место занимает состояние, именуемое «лимбальной недостаточностью» (ЛН).

ЛН характеризуется утратой возможности нормальной реэпителизации роговицы, выполняющей защитные и оптические функции. Целостность и функции роговицы зависят от способности её эпителия к самообновлению благодаря делению стволовых клеток, находящихся в базальной области роговичного лимба. Гибель этих клеток при критических повреждениях роговицы в результате заболеваний или травм является причиной развития ЛН. При ЛН происходит нарастание на роговицу конъюнктивы, сопровождающееся формированием фиброваскулярного паннуса, что приводит к потере прозрачности роговицы и, как следствие, к ухудшению остроты зрения (при локальной ЛН) или слепоте (при тотальной ЛН).

Подходы к лечению ЛН зависят от степени ее тяжести и варьируют от консервативных до инвазивных в комплексе с местной фармакотерапией. В качестве перспективного метода, позволяющего влиять на ход реэпителизации роговицы при тотальной ЛН, рассматривают трансплантацию различных скаффолдов с культивируемыми стволовыми клетками. Успех такого способа реэпителизации роговицы зависит от ряда факторов, среди которых ключевыми являются: высокий репаративный потенциал используемых клеток, оптимальный субстрат для их культивирования, технология трансплантации, рациональная местная фармакотерапия.

В условиях *in vitro* был проанализирован репаративный потенциал стволовых клеток роговичного лимба (СКРЛ) и слизистой оболочки ротовой полости (СКСОРП) человека и кролика. Проведена оценка биосовместимости этих клеток со скаффолдами на основе амниотической мембраны (АМ), гелей коллагена I типа и карбоксиметилцеллюлозы и полилактидных пленок. Исследовано влияние на жизнеспособность клеток применяемых в клинической практике глазных капель различных фармакологических групп. В эксперименте *in vivo* на кроликах с моделью ЛН было показано, что одноэтапная трансплантация СКРЛ на нативной АМ и СКСОРП на децеллюляризованной АМ и двухэтапная трансплантация СКРЛ в коллагеновом геле приводит к нормальной реэпителизации роговицы с сохранением ее прозрачности. Для эффективного применения таких трансплантаций в клинике необходимо свести к минимуму возможность

реализации цитотоксического эффекта сопровождающей фармакотерапии путем ее правильного подбора.

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ, ПОЛУЧЕННОЙ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК ЧЕЛОВЕКА В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

Светлана Алексеевна Александрова¹, Юлия Александровна Нащекина¹, Михаил Георгиевич Хотин¹, Сергей Викторович Надеждин², Екатерина Владимировна Зубарева², Любовь Анатольевна Покровская³, Миральда Ивановна Блинова¹, Наталья Аркадьевна Михайлова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Белгородский национальный исследовательский университет, Белгород, Россия;

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

alekssvet2205@gmail.com

Изучение специфической активности секрета мезенхимных стволовых клеток (МСК) может представлять как фундаментальный, так и прикладной интерес. Целью настоящей работы являлась оценка влияния на адгезионные, пролиферативные и дифференцировочные свойства кондиционированной среды (КС), полученной в процессе культивирования МСК человека, направленных в остеогенную дифференцировку.

Клетки линии FetMSC (выделены из МСК костного мозга эмбриона человека, предоставлены РККП, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) культивировали с использованием роботизированной станции Compact Select T (Sartorius). Клетки культивировали в питательной среде с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки до клеточной массы 7×10^9 клеток, затем инкубировали в остеогенной и бессывороточной средах. После сбора наработанной клетками КС она была отцентрифугирована, профильтрована и сконцентрирована. Полученный концентрат (ККС) подвергали диализу, высушивали и растворяли в бессывороточной среде ДМЕМ (Росмедбио, РФ).

Исследовали активность ККС при разведении его в 50 (0,66 мг/мл) и 100 (0,33 мг/мл) раз. Влияние ККС на адгезионные свойства FetMSC регистрировали после окраски цитоскелета клеток родамин-фаллоидином. Было выявлено усиление степени распластанности клеток через 2 ч инкубации по сравнению с контролем — в присутствии 0,33 мг/мл ККС клетки были распластаны в 3 раза больше, 0,66 мг/мл — почти в 4 раза. Пролиферативная активность FetMSC через 7 сут. инкубации в присутствии ККС (обеих концентраций) соответствовала уровню значений в контроле (МТТ-тест). Также было выявлено, что в присутствии ККС (0,66 мг/мл) без добавления остеоиндуктивных факторов МСК направляются в остеогенную дифференцировку. Так, с помощью конфокальной микроскопии было обнаружено превышение значений флуоресценции для факторов транскрипции Runx2, Osterix и YAP1 после 14 сут. культивирования по сравнению с контролем. Значения окраски на щелочную фосфатазу в клетках на 7 сут. была сравнима, а на 14 сут. — значительно превышала значения, полученные для положительного контроля. Уровень накопления ионов кальция в цитоплазме клеток на 14 сут. культивирования был одинаковым с положительным контролем.

Таким образом, экспериментальный образец ККС, полученный в процессе дифференцировки линии МСК человека в остеогенном направлении, обладает адгезионной, пролиферативной и остеоиндуктивной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517XO164.

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПРОЛЕЖНЕВОГО ДЕФЕКТА

Наталья Андреевна Александровна^{1,2}, Владимир Сергеевич Попов², Наталия Владимировна Данилова¹, Александр Вадимович Лобода², Павел Георгиевич Мальков^{1,2}, Павел Игоревич Макаревич^{1,2}

¹ Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

n.alexandrushkina@gmail.com

Трансплантация стволовых и дифференцированных клеток в организм человека с целью восстановления поврежденных тканей нашла широкое применение во многих областях медицины. Однако ограничения, связанные с массовой гибелью и низкой выживаемостью клеток при инъекционном введении, поставили новые задачи в этой области. Одним из решений стало применение клеточных пластов (КП) — многослойных конструкций из клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса. Клетки в составе КП характеризуются высокой жизнеспособностью, а присутствие матрикса и заякоренных в нем растворимых факторов способствует большей эффективности при использовании в терапии.

Для изучения эффективности мезенхимных стромальных клеток (МСК) для заживления пролежней нами была использована мышьяная модель пролежневого дефекта. Трансплантацию сингенных МСК осуществляли путем микроинъекций в края раны или аппликацией КП на ее поверхность. В группе сравнения использовали введение кондиционированной среды МСК, содержащей растворимые факторы, вырабатываемые клетками. Заживление дефекта оценивали по скорости уменьшения площади дефекта на макрофотографиях и по динамике изменения толщины грануляционной ткани (ГТ), а также плотности сосудов и зоны фиброза на 3, 7, 14 и 21 сутки на срезах ткани.

Трансплантация КП значительно ускорила заживление дефекта по сравнению с контролем и другими группами — к 21 дню в группе КП у 100% животных наблюдалось полное закрытие дефекта. Морфометрический анализ гистологических срезов показал, что толщина ГТ в зоне дефекта значимо увеличена в группе применения КП на 7 день наблюдения по сравнению с остальными группами. Кроме того, трансплантация КП приводит к ускорению процесса фиброобразования ткани — уже на 14 день наблюдалось активное созревание ГТ с образованием рубца, в то время как в остальных группах процесс был либо слабо выражен (суспензия МСК, кондиционированная среда), либо отсутствовал (группа без терапии).

Применение КП из МСК продемонстрировало высокую эффективность в заживлении пролежневого дефекта по сравнению с отрицательным контролем и применением клеток в суспензии (по скорости закрытия дефекта, показателям формирования ГТ и рубца), что подтверждает перспективность применения КП для стимуляции заживления пролежней, а также дает возможность более детально изучить механизмы, ответственные за эти процессы.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова и поддержано грантами РФФИ № 17-04-01452 и Президента РФ № МК-1068.2019.7.

ВЛИЯНИЕ КОРОТКОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ФЕНОТИП И СЕКРЕТОМ МОНОЦИТ-ПРОИЗВОДНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Ольга Юрьевна Алексеева, Полина Ивановна Бобылева, Елена Ромуальдовна Андреева

ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

alekseeva.olgay@gmail.com

Гипоксические условия оказывают значимое регуляторное воздействие на свойства мезенхимальных стромальных клеток (МСК), а также моноцитпроизводных макрофагов (МН/МФ), что может повлиять на результат взаимодействия этих клеток.

Цель: изучение влияния гипоксического стресса на фенотип и секретом МН/МФ при прямом и паракринном взаимодействии с МСК *in vitro*.

Моноциты (МН) выделяли из фракции мононуклеаров периферической крови человека, а МСК из жировой ткани человека и культивировали в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). Для оценки функционального статуса и активности МН/МФ проводили их со-культивирование с МСК. Со-культивирование проводили в течение 6 дней, после чего клетки подвергались короткому (24 ч) гипоксическому воздействию (1% O₂). Фенотип МН и МН/МФ был охарактеризован методом проточной цитометрии по следующим маркерам — созреванию (CD11b), провоспалительная активация (CD80, CD86, HLA-DR) и M2 (противовоспалительный) фенотип (CD163, CD206). Изменение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов определяли при помощи полимеразно-цепной реакции. Паракринный профиль МН/МФ оценивали по внутриклеточному содержанию цитокинов с помощью твердофазного иммуно-ферментного анализа.

В присутствии МСК МН/МФ проявляли признаки M2 поляризации, о чем свидетельствовало увеличение экспрессии CD163 и CD206.

Поляризация фенотипа МН/МФ в присутствии МСК, как считается, сопровождается сдвигом профиля продукции растворимых медиаторов. Мы не обнаружили при взаимодействии МН/МФ с МСК изменения транскрипционной активности *IL10*, *IL12*, *TNFA*. В тоже время, отмечено достоверное увеличение транскрипционной активности *IL6* при паракринном взаимодействии с МСК. Гипоксический стресс вызывал достоверное повышение экспрессии *IL6* в МН/МФ.

Оценка внутриклеточного содержания цитокинов *IL-6*, *IL-10*, *TNF-α* в МН/МФ показала многократное увеличение концентрации *IL-6* при взаимодействии с МСК, что

подтвердило формирование МН/МФ фенотипа, обозначаемого как МСК-обученные макрофаги. Мы не выявили изменение внутриклеточного содержания *IL-10* и *TNF-α* в МН/МФ. Короткий гипоксический стресс не влиял на уровень цитокинов *IL-6*, *IL-10*, *TNFα* в МН/МФ в монокультуре и при сокультивировании с МСК.

Короткое гипоксическое воздействие не влияло на фенотип макрофагов, а взаимодействие с МСК усиливало формирование M2 фенотипа и их функциональную активность.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-00942.

ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ В УСЛОВИЯХ 2D И 3D КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПОСЛЕ СУБЛЕТАЛЬНОГО ТЕПЛООВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Лариса Леонидовна Алексеенко, Алиса Павловна Домнина, Ольга Геннадиевна Люблинская, Ирина Викторовна Кожухарова, Наталья Алексеевна Пуговкина, Ирина Исааковна Фридлянская, Николай Николаевич Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

al.l@mail.ru

Возможность использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) для клеточной терапии различных заболеваний является предметом интенсивных исследований. Одним из способов повышения выживаемости трансплантированных клеток является культивирование МСК в виде трехмерных (3D) клеточных агрегатов — сфероидов. Цель настоящей работы — изучение молекулярно-генетического профиля МСК в сфероиде (3D МСК) и монослойных МСК (2D МСК), подвергнутых тепловому стрессу (45°C, 30 мин.). Исследования проводились на мезенхимных стволовых клетках эндометрия человека (эмСК). Для получения 3D сфероидов, эмСК культивировали в висячих каплях. Методами Real-Time PCR и ELISA в 3D эмСК было обнаружено усиление экспрессии противовоспалительных и ангиогенных факторов (TSG-6, HGF, EP2 и VEGF) по сравнению с 2D эмСК. Культивирование клеток в сфероиде приводило к изменению экспрессии генов ремоделирования хроматина (SMARCA1, CHD1, KMT2B и др.), генов EMT/MET переходов (E-cadherin, N-cadherin, TWIST1 и др.) и повышению уровня маркеров плюрипотентности. В 2D и 3D эмСК тепловой шок (ТШ) вызывал активацию защитных механизмов клеток. Через 3 часа после ТШ многократно усиливалась экспрессия генов белков теплового шока (БТШ) HSP40, HSP70 и HSP90, однако паттерн экспрессии БТШ в 3D и 2D эмСК различался. Через 3–6 часов после ТШ была обнаружена гибель 3D эмСК за счет активации апоптозных путей: наблюдалось появление annexin V⁺ клеток и активация caspase-3. Жизнеспособность 2D эмСК не отличалась от контрольного уровня, однако в течение нескольких суток после ТШ проявились признаки стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS): арест клеточного цикла, усиление экспрессии p21, изменение клеточной морфологии и появление β-галактозидазной активности. Результаты наших исследований выявили различия в паттерне экспрессии генов, составе секретируемых факторов, а также реализации стресс-активируемых защитных механизмов в 2D и 3D эмСК. При одинаковом тепловом воздействии 3D эмСК

подвергаются апоптозу, а 2D эмСК проявляют признаки SIPS. Высокий терапевтический потенциал 3D эмСК, вероятно, обеспечен усиленной экспрессией противовоспалительных и ангиогенных факторов и эффективным ответом на стрессовые воздействия.

Работа была поддержана Российским научным фондом (проект 19-14-00108) и программой научных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДМСО В СОСТАВЕ КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОРОСЯТ

**Сабина Гульзаровна Али,
Галина Анатольевна Божок**

*Отдел криоэндокринологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
Харьков, Украина*

sabina.ali92@yandex.ru

Криоконсервирование культур клеток, полученных из спинальных ганглиев (СГ), является актуальным для биомедицинских исследований и фармакологии. СГ содержат мультипотентные клетки-производные нервного гребня, способные дифференцироваться в нейроны и субпопуляцию глиальных клеток, что открывает возможность их использования в регенеративной медицине. Сегодня один из наиболее часто применяемых криопротекторов — диметилсульфоксид (ДМСО), однако в литературе накапливаются данные о высокой токсичности 10% ДМСО в составе криосред, разрабатываемых для терапевтического использования.

Цель работы — исследовать влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток СГ неонатальных поросят.

Суспензию клеток СГ 1-дневных поросят получали по методу de Luca и соавт. и культивировали в среде α -MEM с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) и антибиотиками при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Для криоконсервирования использовали среды на основе α -MEM и 25% ФТС, содержащие ДМСО в концентрациях 5, 7,5 и 10%. Криоконсервирование проводили по трехэтапной программе замораживания с начальной скоростью 0,5°C/мин. до -20°C, далее со скоростью 1°C/мин. до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Контроль — интактная культура.

Установлено, что культура клеток СГ неонатальных поросят гетерогенна по составу. Она содержит тела чувствительных нейронов и нейроглиальные клетки. Нейроглия была представлена 3 морфологическими типами клеток: крупными распластанными мультиполярными клетками, мелкими веретеновидными клетками с двумя небольшими отростками, полигональными клетками с удлиненными отростками. Было установлено, что криоконсервирование культуры клеток в среде, содержащей 7,5% ДМСО, сохраняет все вышеописанные морфологические типы клеток, а также позволяет получить до 90% жизнеспособных клеток после отогрева. Использование ДМСО в концентрациях 5 или 10% менее предпочтительно, поскольку тогда данный показатель не превышает 83%. Концентрация ДМСО в криозащитной среде не оказывала влияния на скорость формирования монослоя после размораживания образцов

Таким образом, для криоконсервирования культуры клеток СГ неонатальных поросят оптимально использование 7,5% ДМСО, так как это позволяет сохранить жизнеспособность и морфологические характеристики культуры на уровне, близком к интактной. Все вышесказанное позволяет рекомендовать данный состав среды для низкотемпературного консервирования культур клеток, полученных из нервных ганглиев.

НАРУШЕНИЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОРГАНОГЕНЕЗА СЕРДЦА ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ ЛАКТОЗЫ

Ольга Владимировна Анацкая¹, Андрей Леонидович Рунов¹, Максим Сергеевич Вонский¹, Марианна Викторовна Харченко¹, Сергей Владимирович Пономарцев¹, Артем Уристович Елмуратов², Александр Евгеньевич Виноградов¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт биомедицинской химии, Москва, Россия

olga.anatskaya@gmail.com

Многочисленные статистические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что воспалительные процессы и задержка роста в раннем детстве повышают риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) десятилетия спустя. Одной из частых причин подобных симптомов в детском возрасте является непереносимость лактозы (НЛ), приводящая к дисбиозу, воспалению, ацидозу, окислительному стрессу, гибели недифференцированных клеток и ускоренному старению. В связи с этим, мы предположили, что НЛ новорожденных может быть одной из причин длительной дисфункции сердца. Чтобы проверить эту гипотезу, мы разработали модель неонатальной НЛ у крыс. Заболевание вызывали перегрузкой фермента лактазы диеты с повышенным содержанием лактозы с 10 по 21 дни после рождения. Доза дополнительной лактозы в диете соответствовала возрастному фактору безопасности фермента лактазы. Материал для исследования получали от 21 дневных животных и от животных в возрасте 16-ти недель. Диета вызвала заметное и длительное снижение массы тела, атрофию сердца, гипертрофию почек, печени и поджелудочной железы. Эхокардиография выявила долговременное утолщение межжелудочковой перегородки, уменьшение фракции ускорения левого желудочка (ЛЖ) и увеличение диастолического диаметра ЛЖ, что указывает на развитие кардиомиопатии смешанного типа и нарушение постнатального органогенеза сердца. Цитофотометрия и анализ изображений кардиомиоцитов показали догвременную деформацию клеток, избыточную полиплоидию, нестабильность хромосом и деформацию ядер. Количественная ОТ-ПЦР, транскриптомный анализ и иммунофлуоресценция обнаружили активацию фетальных маркеров TGF- β 2 и MYH 7 и подавление маркеров дифференцировки EGR1 и MYH6. Оценка уровней мРНК генов, которые являются мишенями этих регуляторов, подтвердила скоординированную активацию сетей эмбиональности и подавление сетей дифференцировки. В целом, наши результаты являются первым свидетельством того, что НЛ новорожденных может вызывать длительное ухудшение работы миокарда, ремоделирование кардиомиоцитов и активацию в них программ эмбриональности. Таким образом, ЛМ можно рассматривать как новый, скрытый фактор онтогенетического программирования ССЗ.

РАЗРАБОТКА ИСКУССТВЕННОГО АНАЛОГА РОГОВИЦЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

Юрий Владиславович Андреев¹, Андрей Юрьевич Андреев^{1,2}, Сергей Петрович Домогатский^{2,3}, Егор Олегович Осидак²

¹ ООО «Глазная Клиника ЛЭК», Москва, Россия;

² ООО фирмы «Имтек», Москва, Россия;

³ Лаборатория иммунохимии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

docandreev@gmail.com

По недавней оценке ВОЗ, в мире насчитывается приблизительно 23 миллиона людей, которые потеряли зрение из-за патологии роговицы. Наиболее эффективным методом лечения является кератопластика. Однако нехватка донорского материала и наличие ряда патологий делающих классическую кератопластику малоэффективной в виду осложнений со стороны иммунной системы является актуальной проблемой.

Одним из возможных вариантов решения данной проблемы является разработка биосовместимого материала, с минимальной иммуногенностью, проницаемого для клеток и обладающего необходимой степенью прозрачности и биомеханики.

Ранее, мы показали в экспериментах *in vivo* применение разработанных нами коллагеновых мембран, имплантируемых в толщу роговицы. Материал оставался прозрачным на протяжении всего хода эксперимента, отсутствовали воспалительные и иммунные реакции.

Однако ввиду конструктивных особенностей данные мембраны затруднительно использовать в качестве полноценной замены роговицы или структурного участка её ткани. Поэтому, используя биополмерный матрикс на основе коллагена Viscoll, мы создали прочные, прозрачные, стерильные коллагеновые гидрогели фиксированной толщины, которые могут быть использованы в качестве стромального эквивалента роговицы.

Проведенные нами исследования в *in vivo* модели глубокой послойной передней кератопластики (DALM) на глазах кроликов продемонстрировали принципиальную возможность решения проблемы создания полнофункционального искусственного аналога стромы роговицы. А совмещение разработанного нами стромального эквивалента с современными клеточными технологиями позволит приблизиться к созданию полноценного аналога роговицы.

Результатом такого совмещения станет новый биомедицинский клеточный продукт, который позволит лечить ряд патологий роговицы и будет лучшей альтернативой применению донорских тканей.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК: ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ ПРИ «ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ» ГИПОКСИИ

Елена Ромуальдовна Андреева¹, Диана Константиновна Матвеева¹, Людмила Борисовна Буравкова^{1,2}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

andreeva_er@mail.ru

Факторы клеточного микроокружения, такие как низкий уровень O_2 , играют важную роль в модификации клеток, в том числе и в метаболизме внеклеточного матрикса (ВКМ). Несмотря на то, что интерес к эффектам депривации O_2 на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) постоянно увеличивается, данных относительно модификации матрикса МСК при гипоксии, практически нет. При этом данные, полученные на других клетках стромального дифференциала, указывают на принципиальное значение концентрации O_2 в формировании ВКМ.

Сравнительный анализ показал, что МСК, постоянно культивируемые в условиях «физиологической» гипоксии (5%) и при нормоксии (20%), продуцируют хорошо развитый ВКМ, практически не различающийся по содержанию коллагеновых и неколлагеновых компонентов. Иммуноцитохимически идентифицированы мажорные молекулы этих компартментов — коллаген I типа и фибронектин.

Полногеномный скрининг дифференциальной экспрессии матрикс-ассоциированных генов в МСК при 5 и 20% выявил изменения в транскрипции ряда генов, кодирующих белки основного («core») матрикса: коллагеновых белков, гликопротеинов, протеогликанов, и матрисом-ассоциированных белков: протеаз и ВКМ-ассоциированных молекул. При «физиологической» гипоксии (5% O_2) выявлено снижение экспрессии генов коллагенов базальных мембран (*COL: 4A1, 5A1, 5A2*), структурных белков *COL: 1A1, 1A2, 3A1, ELN*), гликопротеинов — *FN, FNDC1*, протеогликанов — *ACAN, BGN, MGP*. В то же время была увеличена экспрессия генов металлопротеаз *MMP2, MMP3, ADAM23* и подавлена транскрипция их ингибиторов (*TIMP3, CRIM1, CST6*).

Согласно базе NuroxiaDB для более чем половины генов «core» матрикса и почти всех матрисом-ассоциированных генов верифицированы гипоксия-зависимые механизмы регуляции. Верификация с помощью ОТ-ПЦР подтвердила данные полногеномного скрининга.

Полученные результаты показывают, что в условиях «физиологической» гипоксии МСК накапливают внеклеточный матрикс также эффективно, как в стандартных условиях культивирования при 20% O_2 . Обнаружен сдвиг профиля транскрипции ВКМ-ассоциированных молекул: снижение активности генов, ответственных за продукцию матрикса, и повышение активности генов ферментов, его деградирующих; снижение экспрессии генов интегринов, которые «заякоривают» клетки к матриксу, дает основание предположить, что в случае повреждения МСК окажутся более «подготовленными» к реализации репаративных свойств, таких как миграция и пролиферация.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН № 43П.

СЕРОВОДОРОД ЗАЩИЩАЕТ ОТ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ И МЕЛАНОМНЫЕ КЛЕТКИ

Наталья Вячеславовна Андреева¹, Кирилл Вячеславович Зотов², Владимир Исаакович Юсупов², Александр Вадимович Белявский¹

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии, Москва, Россия;

² Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника», Москва, Россия

muha-05@bk.ru

Наряду с оксидом азота (NO) и оксидом углерода (CO), сероводород (H₂S) является важнейшим вторичным мессенджером газообразной природы. В организме человека H₂S участвует в противовоспалительных реакциях, а также обладает цитопротекторным действием.

Считается, что инфракрасное излучение действует на эукариотические клетки главным образом через цитохром С оксидазу митохондрий, и при высоких дозах может приводить к гибели клеток. Поскольку H₂S также оказывает влияние на митохондрии и при высоких концентрациях ингибирует цитохром С оксидазу, представляло интерес выяснить, способен ли H₂S модифицировать эффекты лазерного облучения.

В ходе работы мы облучали мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и меланому Mel IL лазерным светом с длиной волны 835 нм в двух дозовых режимах: 90 кДж/м² и 540 кДж/м². В качестве донора H₂S использовался NaHS. В одну часть образцов клеток NaHS вводился перед облучением, в другую — сразу после облучения до конечной концентрации 10, 20 и 50 мкМ. Присутствие NaHS в концентрациях 10, 20 и 50 мкМ значительно и дозозависимо ослабляло негативный эффект излучения.

Таким образом, H₂S оказывает эффект на внутриклеточные процессы, происходящие после облучения, поскольку его действие сохраняется при добавлении донора H₂S через несколько часов после облучения. В ряде публикаций было показано антиоксидантное действие сероводорода. По некоторым данным, высокие дозы лазерного облучения увеличивают в митохондриях концентрацию супероксидных анион-радикалов, что приводит к цитотоксическим эффектам. Можно поэтому предположить, что защитное действие H₂S при облучении связано с его антиоксидантной функцией.

Работа финансировалась за счет проекта РНФ № 18-14-00300.

КЛЕТочная ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ГОРТАНИ И ТРАХЕИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ

Наталья Георгиевна Антоневиц^{1,2}, Андрей Евгеньевич Гончаров^{1,2}, Валерий Леонидович Чекан^{3,4}, Эльвира Анатольевна Стринкевич^{3,4}

¹ Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь;

² Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь;

³ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии», Минск, Беларусь;

⁴ Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

antonevich.n@gmail.com

Введение. Стенозы гортани и трахеи (СГТ) представляют собой анатомическое сужение дыхательных путей, приводящее к дыхательной недостаточности. Основной причиной приобретённых стенозов являются травмы, полученные в ходе медицинских вмешательств. Повреждение слизистой оболочки инициирует местное воспаление, приводит к нарушению эпителизации, рецидивирующему формированию грануляционно-рубцовой ткани и хронизации патологического процесса. При этом подавление местного воспаления для восстановления тканевого гомеостаза и барьера слизистой оболочки является ключевой задачей. Известно, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) проявляют широкий спектр иммуномодулирующей активности и могут быть эффективны в клеточной терапии ХСГТ.

Цель исследований: оценить безопасность, переносимость и клиническую эффективность клеточной терапии ХСГТ с использованием аутологичных МСК обонятельной выстилки (ОВ)

Материалы и методы. В клинические испытания включено 7 пациентов с диагнозом ХСГТ (J38.6, J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса (NCT03130374 в clinicaltrials.gov). Биомассу аутологичных МСК ОВ накапливали на 3–6 пассажах, контролировали подлинность (CD73⁺CD90⁺CD105⁺CD31⁻Lin⁻CD45⁻HLA-DR⁻), стерильность. Вводили 10 млн МСК ОВ на 1 см² слизистой оболочки в дополнение к стандартному хирургическому лечению.

Результаты. Медианное число госпитализаций пациентов до проведения клеточной терапии составило 4. Спустя 5–7 суток после стандартного хирургического лечения отмечался отек слизистой, происходил рост грануляционной ткани, выявлялась фибриновая пленка. Выраженное разрастание соединительной ткани требовало повторных хирургических вмешательств спустя 2–3 месяца. После локального одно- (n=5) или двукратного (n=2) введения МСК ОВ побочные местные и системные явления отсутствовали. Переносимость и безопасность метода клеточной терапии определена как хорошая. Через 2–3 месяца после клеточной терапии не выявлено признаков рестенозирования: роста грануляционной ткани, образования рубцов, сужения просвета дыхательных путей. Спустя 1–2 года после клеточной терапии все пациенты наблюдаются амбулаторно без признаков нарастающей дыхательной недостаточности

и рестенозирования. Отмечено улучшение показателей функции внешнего дыхания и повышение толерантности к физической нагрузке.

Заключение. Клеточная терапия ХСГТ с применением аутологичных МСК ОБ безопасна, хорошо переносима, предотвращает рестенозирование и может быть использована в комплексном лечении заболевания.

ЭКСТРАСНАПТИЧЕСКИЕ NMDA РЕЦЕПТОРЫ РЕГУЛИРУЮТ ПРОЦЕСС СОЗРЕВАНИЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ЧЕЛОВЕКА

**Станислав Анатольевич Антонов,
Екатерина Вячеславовна Новосадова,
Игорь Анатольевич Гривенников**

*Институт молекулярной генетики РАН, Москва,
Россия*

vamore@inbox.ru

Получение дофаминергических (ДА) нейронов путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека открывает уникальные возможности для изучения патогенеза болезни Паркинсона *in vitro*. В настоящее время, созревание пост-митотических нейронов человека рассматривается как длительный автономный процесс, зависящий, главным образом, от времени дифференцировки. В этой связи, изучение механизмов, координирующих созревание ДА нейронов является актуальной задачей, и может способствовать увеличению эффективности существующих методов нейрональной дифференцировки ИПСК.

NMDA рецепторы (NMDA-R) являются доминантным типом ионотропных глутаматных рецепторов в развивающейся нервной системе, и вовлечены в управление процессом дифференцировки многих типов нейронов. В данной работе с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания было обнаружено, что субъединицы GluN1 и GluN2A NMDA-R экспрессируются в сомах и проксимальных участках нейритов иммунопозитивных к тирозингидроксилазе (TH⁺) ДА нейронов, получаемых из различных линий ИПСК. Ранее нами было показано, что в ДА нейронах на 15–30 день дифференцировки *in vitro* NMDA-R являются функциональными, поскольку их активация приводит к возникновению транзиторного низкоамплитудного увеличения внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Ультраструктурный анализ ДА нейронов на данном этапе дифференцировки не выявил наличия синаптических контактов, что свидетельствует об экстрасинаптической локализации NMDA-R в изучаемых клетках.

Установлено, что ДА нейроны, дифференцирующиеся в среде, содержащей селективный антагонист NMDA-R МК-801 в концентрации 10 μM, имеют выраженные морфологические отличия от контроля. Размер сомы (67,7±26,2 μm²) в TH⁺ клетках был достоверно ниже по сравнению с контрольными значениями (121,9±46,2 μm²). Кроме того, в присутствии МК-801 наблюдалась тенденция к уменьшению числа бифуркаций нейритов (2±2) по сравнению с контролем (4±2).

Полученные данные свидетельствуют об участии экстрасинаптических NMDA-R в регуляции роста ДА нейронов человека при их дифференцировке. Это позволяет предполагать, что модуляция NMDA-R может являться потенциальным инструментом для управления процессом созревания ДА нейронов *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-01661).

БИОФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА RGD-ПЕПТИДАМИ: ИТОГИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Лариса Валерьевна Антонова¹, Евгения Андреевна Сенокосова¹, Владимир Николаевич Сильников², Евгения Олеговна Кривкина¹, Андрей Владимирович Миронов¹, Леонид Семенович Барбараш¹

¹ *НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия;*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

antonova.la@mail.ru

Модифицирование RGD пептидами полимерных сосудистых протезов может обеспечить стимулирование ранней и качественной его эндотелизации.

Цель исследования — определить оптимальный вариант модифицирования RGD-пептидами поверхности сосудистых графтов на основе полигидроксibuтирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL).

Материалы и методы. Графты PHBV/PCL диаметром 1,5 мм изготовлены методом электроспиннинга и модифицированы аминами 1,6-гексаметилендиамин (A1) или 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (A2) и пептидами: RGDK (P1), AhRGD (P2), циклический пептид c[RGDFK] (P3) в течение 10, 30 или 60 мин. Архитектоника поверхности графтов изучена методом сканирующей электронной микроскопии. Проведены физико-механические испытания графтов, анализ гемосовместимости, биосовместимости *in vitro* с использованием колониеформирующих эндотелиальных клеток (CFECs). Проходимость графтов с RGD, имплантированных в сосудистое русло крыс на 1 и 3 месяца, оценивали методом УЗИ. Качество эндотелизации внутренней поверхности эксплантированных образцов графтов и формирование других элементов новообразованной сосудистой ткани осуществляли методами гистологического и иммунофлуоресцентного исследований.

Результаты. Оптимальное время аминлиза графтов, существенно не менявшее структуру и физико-механические свойства сополимерного каркаса, составило 60 мин. — для A1 и 30 мин. — для A2. Наибольшая степень деформации тромбоцитов отмечена на поверхности графтов A1P2 и A1P3. Максимальная адгезия и жизнеспособность CFECs выявлена на поверхности A2P3. Ускорение процессов эндотелизации внутренней поверхности графтов и сохранение эндотелиального монослоя спустя 3 месяца имплантации имело место в 100% графтов A2P1 и A2P3. В стенке данных графтов наблюдалась лучшая регенерация сосудистой ткани и меньшая склонность к кальцификации.

Выводы. Оптимальные варианты модифицирования RGD-пептидами поверхности сосудистых графтов PHBV/PCL — использование пептидов RGDK и c[RGDFK], иммобилизованных через длинный линкер 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine.

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ СОСУДИСТЫЕ ЗАПЛАТЫ ДЛЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА

Лариса Валерьевна Антонова, Андрей Владимирович Миронов, Виктория Владимировна Севостьянова, Евгения Олеговна Кривкина, Татьяна Владимировна Глушкова, Елена Анатольевна Великанова, Леонид Семенович Барбараш

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

a.mir80@mail.ru

Большое количество осложнений в результате проведения операций каротидной эндартерэктомии с использованием сосудистых заплат делает необходимым разработку новых биосовместимых материалов, подходящих для реконструкции сосудистой стенки. Перспективным подходом — использование комбинации биodeградируемого полимера и биоактивных молекул, стимулирующих регенерацию сосудистой ткани.

Цель исследования — оценить эффективность применения биodeградируемого матрикса на основе поликапролактона (PCL), содержащего сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), в качестве сосудистых заплат для артериальной реконструкции.

Материалы и методы. Сосудистые заплаты изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanop-01A (MECC) из смеси (20:1) 14% (w/v) раствора PCL в трихлорметане и раствора рекомбинантного VEGF крысы в физиологическом растворе (10 мкг/мл). Немодифицированные сосудистые заплаты изготавливали из чистого раствора 14% (w/v) PCL в хлороформе при параметрах, описанных выше. В качестве группы сравнения использовали коммерческие сосудистые заплаты из бычьего ксеноперикарда (КемПериплас-Нео, ЗАО НеоКор), используемые при проведении каротидной эндартерэктомии.

Результаты. Коммерческие заплаты из ксеноперикарда обладали лучшими механическими свойствами по сравнению с заплатами PCL/VEGF, однако после имплантации в аорту крыс они в значительной степени подвергались структурной дегенерации. Заплаты PCL/VEGF сохраняли свою целостность при длительном сроке имплантации. Высокая пористость биodeградируемого материала способствовала его эффективному заселению клетками, а VEGF обеспечивал привлечение эндотелиальных клеток на внутреннюю поверхность и поддержание жизнеспособности клеток в толще заплаты, что, в свою очередь, стимулировало формирование новой сосудистой ткани.

Выводы. Биodeградируемый матрикс на основе PCL/VEGF, полученный методом электроспиннинга, имеет значительные перспективы применения в качестве сосудистых заплат для артериальной реконструкции, так как стимулирует формирование элементов кровеносного сосуда и восстановление поврежденной сосудистой стенки.

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ СКАФФОЛДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО РОСТА НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Ольга Юрьевна Антонова, Ольга Юрьевна Кочеткова, Андрей Юрьевич Михеев

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино, Россия

ol_antonova@mail.ru

В настоящее время отсутствуют подходы для контролируемой направленной регенерации нервов и реиннервации органов и тканей, поэтому поиск новых перспективных методов регенерации нервных волокон является актуальным. При разработке тканеинженерных конструкций все больше внимание исследователей привлекает физические аспекты поверхности, поскольку показано, топография поверхности влияет на жизнеспособность, рост и функциональную активность нейронов.

Данная работа направлена на разработку трехмерных нанотопографических скаффолдов, обеспечивающих ускоренный направленный рост отростков нервных клеток.

В настоящее время малоизучен рост клеток на скаффолдах с размером волокон менее 200 нм, основные исследования были сосредоточены в этом направлении. Методом электроспиннинга получены подложки на основе нейлона-4,6 со средним диаметром волокон 15–20 нм и 160 нм с рандомно-структурированными и строго ориентированными волокнами. Данные скаффолды, показали высокую биосовместимость с нервными клетками (нейробластомы человека IMR-32) и независимо от ультраструктуры повышали пролиферацию клеток по сравнению с контролем. Показано, что рандомно-ориентированные нановолокна не инициируют рост нейритов нейронов гиппокампа крыс в доминирующем направлении. В то время как ориентированные волокна оказывают сильное влияние на морфологию нейронов. Морфометрический анализ позволил количественно определить ориентацию нейритов в наноструктурированных скаффолдах и подтвердить индуцированную топогией поверхности направленность растущих отростков. Визуализация Z-стека выявила рост нейритов между волокнами. В отличие от контроля (стекло, покрытие поли-D-лизином) нейроны культивируемые нановолокнах имели длинные нейриты и образовывали развитие нейронные сети. Полученные скаффолды, на основе волокон нейлона 4/6, способствовали значительной элонгации отростков и поляризованности клеток в целом.

Таким образом, наноархитектура и адгезивные свойства, полученных скаффолдов делает их привлекательными для дальнейшей разработки тканеинженерных конструкций.

«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-10097)».

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СПЕРМАТОГЕННОЙ НИШЕ С ПОМОЩЬЮ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Михаил Спартакович Арбатский¹, Георгий Дмитриевич Сагарадзе^{1,2}, Наталия Андреевна Басалова^{1,2}, Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}

¹ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

algenubi81@mail.ru

Мужское бесплодие, проявляющееся нарушениями сперматогенеза, является серьезной социальной и медицинской проблемой. Значительная часть случаев мужского бесплодия является идиопатическими, для которых эффективное лечение отсутствует, поэтому поиск возможных механизмов нарушений сперматогенеза и разработка новых подходов к восстановлению фертильности являются актуальными. Так как жизнеспособность и функция сперматогонимальных стволовых клеток (ССК), дающих начало сперматозоидам, регулируется специфическим микроокружением, или нишей стволовой клетки, нарушение функции ниши может являться причиной бесплодия. При этом, многие поврежденные ниши стволовой клетки способны к восстановлению. Важный вклад в этот процесс могут вносить стромальные клетки, в частности, мезенхимные стромальные клетки (МСК). Так, продемонстрировано участие МСК в восстановлении некоторых ниш стволовой клетки, в особенности, за счет секреции этими клетками спектра биоактивных факторов. Ранее нами было показано, что при экзогенном введении самих МСК или компонентов их секретомы в ткани яичка происходит восстановление поврежденной в эксперименте ниши ССК. Однако, локализация и происхождение МСК в сперматогенной нише и, следовательно, возможность мобилизации пула МСК при повреждении остаются неизученными.

В последнее время новые методы исследования клеточного состава тканей на уровне одиночных клеток позволили установить различные субпопуляции клеток с определенным транскриптомным профилем, в том числе в тканях яичка. Поэтому целью данной работы являлось выявление среди стромальных клеток яичка субпопуляций, схожих по транскриптому с МСК, выделенных из других тканей, с целью установки их локализации и принадлежности к известным популяциям клеток ниши ССК с помощью биоинформатического анализа. Для этого использовали массивы данных секвенирования одиночных клеток жировой ткани человека, а также образцов ткани яичка, полученных от здоровых доноров. Анализ кластеров проводили по транскриптам генов, обнаруженных в обоих массивах данных. Обнаружено, что кластеры, обогащенные генами, сверхэкспрессируемыми в МСК, наиболее близки к кластерам, обогащенными генами, присущими клеткам Лейдига и перидцитам. При этом, данные группы отдалены от кластеров, в которых сверхэкспрессируются гены сперматогенного эпителия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30007.

СОЗДАНИЕ СКАФФОЛДА ЩИТОВИДНОГО ХРЯЦА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ 3D-БИОПРИНТИНГА

Надежда Валерьевна Аргучинская¹, Евгений Евгеньевич Бекетов¹, Егор Олегович Осидак², Феликс Евгеньевич Северюков¹, Петр Викторович Шегай³, Андрей Дмитриевич Каприн³

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия;

² ООО «ИМТЕК», Москва, Россия;

³ ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

nrv1994@mail.ru

Целью исследования было создание скаффолда щитовидного (гиалинового) хряща с применением трёхмерной экструзионной биопечати с механической системой подачи материала.

Материалы и методы. Для создания скаффолда был использован 3D-биопринтер Rokit Invivo (Южная Корея) с ПО версии 1.68. Слайсинг модели проводился в программе NewCreatorK версии 1.57.63. В качестве основного материала использовали ателоколлаген свиньи I типа (ООО «Имтек», Россия), который смешивали с буфером и средой в соотношении 3:1, обеспечивающих запуск полимеризации по ходу печати. В качестве опорного (жертвенного) материала использовали желатин с концентрацией 12%, обеспечивающей состояние геля при комнатной температуре. Подача материала осуществлялась через иглы 21G. Параметры печати: высота слоя — 386 мкм, скорость печати — 5 мм/с, выход материала — 150%, плотность заполнения — 60%.

Результаты. Для создания модели щитовидного хряща были использованы снимки в формате DICOM. Обработку модели и ее модификацию для печати двумя материалами проводили посредством FreeCAD версии 0.17. После получения модели в формате сетки (mesh), она была переведена в твердое тело и вручную выровнена по основанию. Поскольку полученная модель гортани имеет сложную геометрию, её печать без использования опоры была невозможна. Опора являлась своеобразным временным фундаментом для печатаемого изделия и таким образом каждый следующий слой ложился на предыдущий, что позволяло модели не потерять необходимую форму. Для оптимизации процесса печати (время печати, количества материала) часть скаффолда из желатина располагали только в местах, где коллаген не имел точки опоры (предыдущий слой коллагена или печатный столик). Таким образом общий контур опоры из желатина и основной части скаффолда из коллагена был идентичен. После окончания печати конструкцию помещали в CO₂-инкубатор и в результате повышения температуры и изменения pH (за счет наличия среды) опорный материал удалялся, а коллаген стабилизировался.

Выводы. В результате проведенного исследования был получен скаффолд щитовидного хряща гортани человека в масштабе 50% удовлетворительного качества, сохранявший форму после 24 часовой инкубации при 37 °С.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДО-СОРБЦИОННОЙ ОБРАБОТКИ В РЕГЕНЕРАЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Дмитрий Валерьевич Архипов, Александр Анатольевич Глухов, Дмитрий Андреевич Атякин, Александр Алексеевич Андреев

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

sugery@mail.ru

Цель исследования — изучить в экспериментальных условиях эффективность применения метода струйной кислородо-сорбционной обработки (СКСО) на регенерацию мягких тканей.

Материалы и методы. Исследование проведено на 150 белых крысах линии Wistar в 5 группах: 4 контрольных и 1 опытной. Для изучения регенерации у животных под наркозом препаратом «Золетил-100» в асептических условиях в области холки моделировали раны мягких тканей путем иссечения по шаблону кожи и подкожной клетчатки с поверхностной фасцией. В 1 контрольной группе лечение не проводилось. Во 2 и 3 контрольных группах раны обрабатывались струей воздуха и кислорода, соответственно; в 4 контрольной — на дефект наносился сорбент, в 1 опытной группе — проводилась СКСО, которая осуществлялась при помощи специального устройства с расстояния 10–15 см под углом 30–45°. Изучение эффективности СКСО проводили с использованием объективных, планиметрических, гистологических, гистохимических и статистических методов исследований.

Результаты исследования. При анализе местных признаков воспаления было выявлено, что обработка ран струей кислорода практически не давала преимуществ по сравнению с обработкой воздухом. Наиболее выраженные изменения были зафиксированы при нанесении сорбента и применении СКСО — ускорение купирования изучаемых симптомов в 1,1–1,3 и в 1,2–1,5 раза, соответственно, по сравнению с 1 контрольной группой. Средняя площадь ран была минимальна в 1 опытной группе и составила на 3, 5, 7 и 10 сутки 42,7%, 74,0%, 90,3% и 99,5%, соответственно, по сравнению с исходными данными. Во всех группах отмечался рост средней оптической плотности РНК с максимальными значениями в 1 основной группе, где он достигал к 7 сут. $0,34 \pm 0,02$ усл. ед. Средняя оптическая плотность SH-групп к 7 сут. была наиболее выраженной в 4 контрольной и 1 основной группах, к 10-м суткам наблюдалось ее нивелирование в 1 основной группе.

Таким образом, применение СКСО приводило к наиболее быстрому купированию симптомов воспаления по сравнению с 1 контрольной группой — в 1,2–1,5 раза; максимальному сокращению средней площади ран — до 99,5% к 10 сут. по сравнению с исходными данными; максимальному повышению оптической плотности РНК и SH-групп к 7 сут. и нормализации SH-групп к 10 сут., что в совокупности указывает на наиболее высокую активность репаративных процессов в 1 основной группе.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Манарбек Бапович Аскарар, Абай Кабатаевич Байгенжин, Темирлан Сибирьевич Карибеков, Максат Аскерович Жантурганов, Айгерим Хайруллаевна Жакупова, Назгуль Косбергеновна Кульмырзаева, Болат Габассович Купенов

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан (Астана), Казахстан

naz2010@mail.ru

В патогенезе хронической сердечной недостаточности (ХСН) и дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) имеют место иммунное воспаление, системная воспалительная реакция (СВР). Стволовые клетки костного мозга (СК КМ) за счет экспрессии пептидов, факторов роста и цитокинов, способствуют ингибированию СВР, снижая активность фибропластических процессов и активизирует процессы регенерации ткани миокарда.

Цель: оценить безопасность и эффективность трансплантации мононуклеарной фракции клеток костного мозга (МККМ) у больных с выраженной систолической дисфункцией левого желудочка (EF<40%) и дилатационным синдромом (ДС).

Методы исследования. Было обследовано 57 пациентов (50 мужчин и 7 женщин) с выраженным ДС и низкой фракцией левого желудочка (EF<40%), в возрасте от 46 до 63 лет. Из них с истинной ДКМП — 22 пациента, ИКМП — 30, перипортальная кардиомиопатия у 5 женщин. После культивирования в течение 72 часов, суспензию МККМ вводили внутривенно 123×10^6 клеток. Пациенты получали базовую терапию ХСН. Качество жизни определяли по «Миннесотскому опроснику у больных с ХСН (MLHFQ)». Достоверность определяли по t критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Трансплантация клеток не вызывало осложнений, длившаяся 2–2,5 часа, не было сбоев в работе сердца (АД, ЧСС). У всех пациентов отмечено субъективное улучшение общего состояния. Отмечено снижение уровня предсердного натрийуретического пептида (Pro-BNP, исходные данные = 5172 ± 268 ng/ml), раннего маркера сердечной недостаточности через 3 месяца (1047 ± 122 ng/ml; $P < 0,001$). Анализ сердечной функции по данным ЭХОКГ показал, что фракция выброса левого желудочка исходно была низкой и составляла (EF=30%), а после клеточной терапии увеличилась до 36,7%. Также отмечалось уменьшение объемов левого желудочка уже к 3 месяцу — КСО ЛЖ (157мл и 132 мл, соответственно, $P < 0,001$). Уменьшение КДО проходило от 216 мл исходно до 214мл через 3 месяца ($P < 0,05$). Функциональный класс ХСН снизился после клеточной терапии с $3,2 \pm 0,2$ до $1,5 \pm 0,4$ ($P < 0,05$), что свидетельствует об улучшении систолической функции левого желудочка, уменьшения полости сердца и обратное развитие функционального класса ХСН. Отмечалась регуляция СВР (IL1 β /TGF β) и активизация восстановительных процессов (регуляция системы матриксных металлопротеиназ — MMP 2,3,9).

Выводы. Трансплантация МККМ улучшает систолическую и диастолическую функции левого желудочка, уменьшая полость, снижая ФК ХСН, достоверно снижая маркер сердечной недостаточности — Pro-BNP у больных с дилатационным синдромом и ХСН.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА УСТРАНЯЮТ АУТОИММУННЫЕ РЕАКЦИИ И УСКОРЯЮТ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОВРЕЖДЕННОГО УЧАСТКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Манарбек Бапович Аскарлов, Абай Кабатаевич Байгенжин, Темирлан Сибирьевич Карибеков, Андрей Алексеевич Логвиненко, Галия Масугуловна Шаймарданова, Алия Зейнуллаевна Оспанова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан (Астана), Казахстан

s.aigerim.87@mail.ru

Актуальность. Язвенно-воспалительные поражения толстой кишки при неспецифическом язвенном колите (НЯК) обусловлены как местными, так и системными аутоиммунными процессами, что угнетает процессы репаративной регенерации.

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ) продуцируют иммунорегуляторные пептиды, участвующие в регуляции дифференцировки Т-клеток, в направлении CD4⁺CD25⁺ (Т-регуляторов), способствуют активизации процессов восстановительной регенерации и могут способствовать устранению аутоиммунных реакций и заживления язв. **Цель** — изучить влияние МСК КМ на содержание CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов и молекулярного маркера регуляторных клеток — FoxP3 в слизистой оболочке желудка, определяющих направленность регенерации язв.

Методика. Под наблюдением было 8 пациентов с НЯК в возрасте от 28 до 46 лет, которым произведена трансплантация (системно) МСК КМ (1 группа) 5 млн клеток; 10 пациентов составили контрольную группу (2 группа) и получали традиционное лечение. Большим обеих групп было проведено иммуногистохимическое изучение слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) до и в динамике лечения (на 3 и 5 сутки) после трансплантации клеток. Образцы ткани забирали при биопсиях из края язвенного дефекта, а также из области постязвенного рубца. Иммуногистохимически в биоптатах СОТК определяли экспрессию CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, FoxP3. Все больные были с длительным анамнезом (>3 лет).

Результаты. При иммуногистохимическом исследовании биоптатов СОТК выявлено большое количество Т-лимфоидных клеток, преобладали CD8⁺ по сравнению с CD4⁺ (3:1). Примерно 40% CD8⁺ клеток составляли NK⁺. Умеренная экспрессия FoxP3-2,25%. Иммунотоморфологическая картина СОТК у больных контрольной (2 группы) в исследуемые сроки практически не менялась в контроле, терапевтический эффект был не выраженным, а заживление язв не наступало.

Клиническое состояние больных в 1 группе улучшалось в первые дни после трансплантации МСК КМ. Колоноскопия СОТК показало быстрое заживление язв на 10–12 сутки с полной эпителизацией. У больных отмечено большое количество CD4⁺ Т-клеток, они преобладали над CD8⁺ клетками; снижение NK⁺ клеток до 11%, а также повышение FoxP3 до 11,65%, тогда как во 2 группе его экспрессия к 5 суткам наблюдения оставалась сниженной до 3,34%.

Трансплантация МСК КМ способствует супрессии пролиферации эффекторных клеток (цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров) и повышению FoxP3, в результате чего наступает ускоренное и качественное заживление язв.

СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНЫМ БИЛИАРНЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Манарбек Бапович Аскарлов, Дана Талаповна Сайпиева, Эльмира Бериковна Кудайбергенова, Айжан Абдисадиковна Ахаева, Айгерим Хайруллаевна Жакупова

АО «Национальный научный медицинский центр» Нур-Султан (Астана), Казахстан

m.askarov@nnmc.kz

Хронический стресс сопровождается вторичным иммунодефицитом. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) продуцируя широкий спектр биологически активных веществ (БВВ) участвуют в регуляции иммунитета и обеспечивают гомеоморфоз тканей.

Цель: исследование секреторной активности МСК в процессе культивирования у пациентов с первичным билиарным циррозом печени (ПБЦ).

Материал и методы. Осуществлен забор костного мозга у 20 пациентов с ПБЦ (1 группа) и у 20 здоровых доноров — МСК пуповинной крови (2 группа). Исследование секреции БВВ: FGF-basic; HGF; IGF-1; IL1 β ; IL-2; TGF β 1; IL-4; TNF α отбирали культуральную среду на 3, 7, 14, 21 сутки культивирования МСК и проводили ИФА, на анализаторе ALISEI Quality System. Для электронной микроскопии брали взвесь МСК при 85% монослое. Клетки фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида с постфиксацией в 1% OsO₄ и заключали в эпон. Полу- и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме «Leica». Срезы окрашивали метиленовым синим — азуром II и основным фуксином по Humphrey и Pittman. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Изучение проводили на электронном микроскопе Libra 120.

Результаты. У больных с ПБЦ выявлена низкая секреция БВВ по сравнению с чем у 20 здоровых доноров — МСК пуповинной крови. У пациентов 1 группы до 14 суток культивирования отмечалась высокая секреция провосп. цитокинов: IL1 β ; IL-2; TGF β 1; TNF α и низкая секреция фактора роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и противовоспалительных цитокинов: TGF β 1; IL-4. По достижении 90% монослоя МСК секреция провоспалительных цитокинов оказалась достоверно ниже противовоспалительных цитокинов. Во 2 группе нами выявлена стабильно высокая секреция всех исследованных БВВ.

Электронномикроскопически в МСК как в 1, так и во 2 группе выявлено беспорядочное распределение актиновых фибрилл цитоскелета. В гиалоплазме — крупные везикулы-эндосомы с плотно упакованными мелкими везикулами, отражающие секреторную активность МСК. Митохондрии с плотным матриксом и ясно различимыми кристами.

Вывод. Секреторная активность МСК костного мозга у больных с ПБЦ была ниже, чем у МСК пуповинной крови. Длительное прекультивирование приводило к восстановлению секреторной активности клеток за счет увеличения секреторных гранул, увеличения количества митохондрий, что в целом свидетельствует о высоком регенераторном потенциале полученных клеток и пригодных для целей регенеративной медицины.

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ХИРУРГИИ КОСТНОГО СКЕЛЕТА ЧЕЛЮСТЕЙ

Игорь Сергеевич Афонин^{1,2}

¹ МСЧ ФСБ РФ по Приморскому краю, Владивосток, Россия;

² Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

igor23-45@mail.ru

В работе представлено исследование биохимических свойств синтезированного остеопластического материала на основе оксида циркония ZrO_2 , допированного фосфатами кальция ГАФ ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) и ТКФ ($Ca_3(PO_4)_2$). Исследована способность данного материала ускорять процессы регенерации в кости, за счет биоактивного состава. Опытным путем доказано отсутствие токсического воздействия материала на организм подопытного.

Цель исследования. Определить степень участия данного материала в процессе регенерации костной ткани.

Материалы и методы. Лунка удаленного нижнего резца кролика заполнялась дисперсной формой биокерамического материала. У подопытного берется кровь на анализ (на 2, 4, 8, 16, 24 сутки) для исключения воспалительных реакций. Одновременно проводятся рентгенологические исследования зоны интереса-нижней челюсти, для отслеживания динамики процессов регенерации костной ткани.

Результаты и обсуждения. Забор крови производится из ушной вены кролика. Исходя из полученных нами данных по клиническому анализу крови, процессов воспалительного характера в организме кролика не выявлено, все основные показатели колеблются в интервале нормы. Повышение уровня кальция в крови свидетельствует и процессе костной регенерации после удаления зуба.

Выводы. Данный материал действительно активно участвует в процессе регенерации костной ткани, не вызывая воспалительных реакций в организме кролика. Данная биокерамика может быть рассмотрена как материал биокерамического класса, со свойствами схожими с костью, которая бы участвовала в репаративном остеогенезе дефектов костной ткани.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОВЕДЕНИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ В МОДЕЛЯХ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Эльвира Руслановна Ахметзянова¹,
Маргарита Николаевна Журавлева¹,
Яна Олеговна Мухамедшина^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

elyaelya18@gmail.com

Клетки микроглии — это резидентные макрофаги центральной нервной системы, первыми отвечающие на инфекции и повреждения выделением специфических протеаз, цитокинов и нейротрофинов. В зависимости от тяжести и срока после травмы спинного мозга, фенотип, цитокиновый профиль, фагоцитарная

активность микроглии способны меняться, оказывая нейродегенеративное либо нейропротективное влияние на окружающие ткани. В связи с этим, целью нашей работы явилось выявление изменений в поведении микроглии на модели травмы спинного мозга in vitro различной степени тяжести.

В ходе выполнения исследования, при помощи Leica Impact One Stereotaxic Impactor For Reproducible Neurotrauma нами была смоделирована травма спинного мозга крысы слабой (1,5 м/с), средней (2,5 м/с) и тяжелой (4 м/с) степени тяжести. Между животными различных экспериментальных групп была выявлена разница в показателях функционального теста BBB и морфометрического анализа (площадь сохраненной ткани и площадь патологических полостей).

Для изучения поведения клеток микроглии при разных степенях травмы спинного мозга на 3 и 60 сутки после повреждения in vitro, нативные клетки культивировали в условиях добавления соответствующих гомогенатов ткани спинного мозга. Было показано, что клетки микроглии при разных условиях способны менять пролиферативную активность. Методом проточной цитометрии выявлены изменения в фенотипе микроглии, культивированной при разных условиях. Анализ ПЦР-РВ также выявил изменения в экспрессии генов в микроглии, культивированной при разных условиях.

Таким образом, на модели травмы спинного мозга in vitro различной степени тяжести и различных сроков показано достоверное изменение в поведении клеток микроглии. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшей разработки подходов к стимулированию нейрорегенеративных процессов в нервной ткани.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00141.

ПЬЕЗОКЕРАМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ, БАКТЕРИЙ, БЕЛКОВ

Ассель Иосифовна Ахметова¹, **Игорь Владимирович Яминский**^{2,3}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

akhmetova@nanoscopy.ru

Принцип работы пьезокерамического биосенсора основан на измерении резонансной частоты колебаний биочипа. В качестве биочипа выступает пьезодиск с нанесенным на него сенсорным слоем. При подаче на биочип переменного электрического напряжения происходят механические колебания и, если частота переменного тока совпадает с частотой механических колебаний, то появляется резонанс — резкое увеличение амплитуды колебаний биочипа. Для детектирования бактерий, вирусов или белков биочип помещается в проточную жидкостную ячейку. Создание потока в проточной жидкостной ячейки увеличивает вероятность попадания мишени на поверхность биочипа, что в конечном итоге увеличивает чувствительность метода и уменьшает время проведения анализа. Сигналом для обнаружения патогена является сдвиг резонансной частоты биочипа при попадании патогена или белка на поверхность. Сигнал регистрируется в виде кривой связывания, которая

отображается в ПО, и указывает концентрацию обнаруженных частиц. В качестве сенсорного слоя биосенсора выступают рецепторные молекулы, например, антитела, отвечающие за биоспецифическое связывание, и вспомогательные молекулы, обеспечивающие надёжную фиксацию и правильное расположение рецепторов. Для создания сенсорного слоя часто используются монослои на основе тиолов, которые наносят после напыления золота на пьезокерамический диск.

Для достижения полной симметрии электрической схемы биочипа нами предложено оригинальное решение с использованием составного пьезокерамического биочипа. В биочипе указанной конструкции электрическое напряжение можно подавать только на внутренние электроды, а наружные электроды необходимо заземлять или держать под не изменяющимся во времени потенциалом. В этом случае достигается симметрия в геометрии биочипа, симметрия в подаче электрических напряжений, и, как следствие, полная симметрия двойных электрических слоев в приповерхностном слое. Использование симметричной конструкции биочипа существенно снижает влияние медленных процессов на границе раздела поверхность биочипа/жидкость на регистрируемый сигнал.

Для дальнейшего увеличения чувствительности биосенсора до уровня единичных патогенов необходимо использовать биочипы существенно меньших размеров с толщиной и диаметром микронных размеров.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТКИ С СЕПТИЧЕСКИМ ШОКОМ

Валерий Вартанович Багдасаров¹, Елена Анатольевна Багдасарова^{1,2}, Оганнес Артаваздович Симонян², Алексей Валерьевич Лондуп², Михаил Евгеньевич Крашенинников², Оксана Андреевна Головина²

¹ ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина ДЗМ», Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первой МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

ovik_87@mail.ru

Иммуноспецифические свойства клеточной терапии с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (аМСК) представляют собой новую терапевтическую стратегию при сепсисе и связанной с ним дисфункции органов (ПОН).

Цель: представляем клиническое наблюдение успешного применения аМСК в лечении септического шока.

Пациентка Ф. 1982 г. поступила в ГКБ им. С.С. Юдина переводом из ЦРБ МО. За 4 дня до перевода пациентке была выполнена торакотомия, лапаротомия по поводу проникающих колото-резаных ранений брюшной полости и грудной клетки. Пациентка переведена в тяжелом состоянии с явлениями острого респираторного дистресс-синдрома. Проводилась комплексная интенсивная терапия, антибактериальная терапия-Левифлоксацин 500 мг 2 раза в сутки в/в.

Несмотря на проводимую терапию у пациентки нарастала отрицательная динамика в тяжести состояния. Скорректирована антибактериальная терапия Меропенем 2 г. 3 раза в день, Линезолид 600 мг 2 раза в сутки.

Несмотря на проводимую терапию у пациентки отмечается прогрессивное ухудшение тяжести состояния,

нарастание явлений ПОН, не коррелирующая с проводимой терапией (APACHE II 25 баллов, SOFA 14 баллов). На фоне правосторонней полисегментарной пневмонии и массивного нагноения послеоперационной раны грудной клетки, возник септический шок. Учитывая вышеприведенные данные, пациента включена в протокол клинического исследования № ГХ2ЦКПРМ КТРП 1/2015, одобренный локальным этическим комитетом ПМГМУ им Сеченова от 17.07.2015 г. На 15 сутки от поступления пациентке введено 250×10^6 аМСК.

При оценке результатов, нами было выявлено, что на 3-и сутки после введения аМСК наблюдалось: снижение лейкоцитов крови с 30×10^9 до 10×10^9 ; снижение уровня лактата крови с 3,05 до 0,98; снижение температуры тела с $39,8^\circ\text{C}$ до $36,6^\circ\text{C}$; увеличение количества суточной мочи со 100 мл до 1800 мл; снижение бальной оценки тяжести состояния по шкале APACHE II с 20 баллов до 10 б, и тяжести ПОН по шкале SOFA с 14 баллов до 6 на 3 сутки и дальнейшее прогрессивное снижение. Следует отметить что, позиционируя аМСК, как иммунорегулирующий инструмент, мы наблюдали на 3 сутки, повышение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, снижение количества натуральных киллеров, С3-комплемента, В2 микроглобулина и церулоплазмينا. Пациентка через 6 дней после введения аМСК переведена из ОРИТ в хирургическое отделение, еще через 6 дней выписана домой.

Выводы. Из всего вышеприведенного хотелось сделать вывод об эффективности аМСК в лечении сепсиса и септического шока.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПОСРЕДСТВОМ ЛИГАНДОВ Т-КАДГЕРИНА: ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ И АДИПОНЕКТИНА

Александра Ивановна Баглай⁴, Мария Николаевна Балацкая², Александр Владимирович Балацкий^{1,3}, Всеволод Арсеньевич Ткачук¹⁻³

¹ Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

baglay.alexandra@yandex.ru

Помимо обеспечения гемостаза тромбоциты играют важную роль в регенерации поврежденных сосудов и тканей. В последние годы экспериментальные и клинические исследования применения плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP), продемонстрировали её эффективность для лечения ран и при регенерации тканей. Для подготовки PRP с высоким регенеративным потенциалом необходимо понимание молекулярно-клеточных механизмов регуляции функций тромбоцитов в норме и при патологии, поскольку их активность существенно варьируется. Так при ожирении происходит изменение профиля липидов и гормонов жировой ткани, что приводит к гиперактивности тромбоцитов.

Недавно нам удалось обнаружить на тромбоцитах рецептор липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), способный вызывать внутриклеточную кальциевую

сигнализацию, — Т-кадгерин. Используя методы проточной цитометрии и конфокальной микроскопии мы подтвердили наличие Т-кадгерина как на тромбоцитах человека, так и на мегакариоцитах (линия МEG-O1). По данным иммуноблота кажущаяся молекулярная масса Т-кадгерина на тромбоцитах отличается от таковой в эндотелиальных клетках (105 и 130 кДа) и составляет более 160 кДа. Наличие гликозилфосфатидилинозитидного якоря, характерного для этого белка в других клетках, у тромбоцитарной формы Т-кадгерина было проверено с помощью специфической фосфолипазы PI-PLC. После обработки ферментом количество Т-кадгерина снижалось, что говорит о присутствии ГФИ-заякоренного Т-кадгерина и на тромбоцитах, и на мегакариоцитах. Анализ образцов РНК тромбоцитов и мегакариоцитов при помощи полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием показал, что в этих клетках присутствует изоформа-1 как и в других клетках.

Помимо ЛПНП у Т-кадгерина есть другой лиганд — гормон жировой ткани адипонектин. Этот гормон, напротив, снижает активность тромбоцитов, как на уровне кальциевой сигнализации, так и на уровне расщепления и адгезии. Снижение концентрации адипонектина при ожирении усугубляет гиперактивность тромбоцитов.

Таким образом, в настоящем исследовании при использовании различных концентраций ЛПНП и адипонектина была показана важность Т-кадгерина как регулятора активности тромбоцитов и необходимость контроля показателей плазмы при использовании PRP.

Работа поддержана грантом Президента РФ МК-3144.2019.7 и РФФИ № 18-015-00372.

ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫЕ СМЕСИ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА И БЕЛКОВ КРОВИ — ОТ ИССЛЕДОВАНИЯ СОВМЕСТИМОСТИ КОМПОНЕНТ К КОНТРОЛИРУЕМОЙ СТРУКТУРЕ БИОМАТЕРИАЛА

Дмитрий Владимирович Багров^{1,2}, Елизавета Робертовна Павлова¹, Игорь Игоревич Никишин², Анастасия Ивановна Соколова^{1,2}, Александра Сергеевна Богданова¹, Дмитрий Владимирович Клинов¹

¹ *Лаборатория медицинских нанотехнологий, ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия;*

² *Кафедра биоинженерии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

dbagrov@gmail.com

Для развития тканевой инженерии необходимо создание биорезорбируемых материалов с контролируемой структурой и кинетикой деградации. Один из подходов к решению этой задачи состоит в формировании смесей из традиционных биомедицинских полиэфириров с белками, причем не только с малорастворимыми в воде структурными белками (например, коллагеном или эластином), но и с растворимыми, например, белками крови. Соотношение компонент такой смеси и их распределение в объеме материала будет определять его свойства.

В данной работе мы исследовали смеси из полилактида и двух белков крови (альбумина и фибриногена) и использовали электроспиннинг (электроформование) для изготовления нетканых пленок из этих смесей. Электроспиннинг позволяет формировать изделия, состоящие из волокон с диаметром 100–1000 нм,

которые имитируют структуру внеклеточного матрикса. Хотя возможности использования электроспиннинга для создания биомедицинских изделий подробно описаны, есть лишь единичные работы, которые рассматривают электроформованные полимер-белковые смеси.

Изготовление изделий из смесей полиэфира и белка осложняется их низкой совместимостью, которая приводит к фазовому расслоению. Оно проявляется на этапе приготовления раствора полимера и белка в общем растворителе — 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП). Мы построили фазовую диаграмму трехкомпонентной системы из полилактида, бычьего сывороточного альбумина (БСА) и ГФИП. Мы сравнили структуру нетканых пленок, которые были сформированы из растворов различного состава и проследили взаимосвязь между составом смеси и особенностями морфологии пленки.

Распределение компонент в составе волокон зависит от множества факторов. Используя спектроскопию комбинационного рассеяния света и сканирующую электронную микроскопию с рентгеновским микроанализом, мы показали, что при электроспиннинге полимер-белковой смеси из раствора в ГФИП могут быть сформированы разные по химическому составу типы нановолокон и нанолент — однокомпонентные или двухкомпонентные. В последних полимер и белок совмещаются на масштабе, который определяется диаметром волокна (менее 1 мкм).

Полилактид-белковые смеси более гидрофильные, чем чистый полилактид, и это может улучшать их биосовместимость. Мы надеемся, что аккуратный выбор условий формирования нетканых полилактид-белковых пленок позволит оптимизировать кинетику их деградации и создавать биомедицинские материалы принципиально нового типа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00037).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Абай Кабатаевич Байгенжин, Манарбек Бапович Аскар, Наталия Алексеевна Криворучко, Айгерим Мырзахановна Иманбердиева, Эльмира Бериковна Кудайбергенова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан (Астана), Казахстан

m.askarov@nnmc.kz

Системная склеродермия (ССД) — аутоиммунное заболевание с воспалительными и фибропластическими реакциями и прогрессирующего фиброза внутренних органов. Применение ГСК КМ, с иммуномодулирующими и морфогенетическими, а также ангиогенетическими и антифибротическими свойствами может стать перспективным и эффективным патогенетическим методом лечения ССД.

Цель работы: клиничко-морфологическая оценка эффективности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток аутогенного костного мозга при ССД.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 60 пациентов в возрасте от 27 до 49 лет, с диагнозом системная склеродермия (ССД) по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR, 1980).

Длительность заболевания — более 3 лет. Проведению трансплантации стволовых клеток костного мозга послужила резистентность к иммуносупрессивной терапии (D-пеницилламин, азатиоприн, преднизолон) и высокий индекс активности аутоиммунного процесса (EScSG), согласно критериям Европейской группы по изучению ССД.

Проведена аспирация костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 400 мл. Выделена ГСК КМ. Трансплантацию ГСК КМ проводили системно в объеме до 140×10^6 клеток. Клиническую эффективность оценивали по критериям Европейской группы по изучению ССД. Для морфологической оценки лечения изучали биопсийный материал кожи голени в стадии индурации до и в динамике лечения. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Массон-трихром. Электронно-микроскопическое исследование проводили на электронном микроскопе Libra 120 фирмы Carl Zeiss.

Результаты. Через 3 мес. после трансплантации ГСК КМ отмечено уменьшение плотности кожи и снижение кожного счета с 13,7 до 6,8 баллов. Уменьшение активности ССД по EScSG с 4,1 до 2,1 баллов. При светооптическом исследовании кожи — снижение окрашиваемости соединительной ткани по Массон трихром, уменьшение плотности расположения пучков коллагена с распадом их на фрагменты. Уменьшалось число миофибробластов. Отмечено разрежение фиброзной ткани вокруг сосудов. Появились зачатки потовых желез и волосяных фолликул. Ангиогенез. На уровне электронной микроскопии процесс биодеградации фиброзной ткани проявлялся в форме фиброклазии и активации макрофагов, появлении неактивных и разрушенных форм фибробластов.

Заключение. Трансплантация аутологичных ГСК КМ создают условия для регуляции и ингибирования аутоиммунного воспаления, восстановления морфо-функционального состояния кожи больных ССД.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ II ТИПА

Абай Кабатаевич Байгенжин, Манарбек Бапович Аскар, Ольга Владимировна Ульянова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова, Дана Талаповна Сайпиева, Дина Александровна Серебренникова, Галия Масугтовна Шаймарданова

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан (Астана), Казахстан

aigerim.87@mail.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают иммунорегуляторными и трофическими свойствами. При сахарном диабете 1 типа, собственные иммунные клетки атакуют β -клетки в островках Лангерганса. Сахарный диабет 2 типа (СД2) — заболевание, связанное с инсулинорезистентностью. Недавние исследования показали связь его с иммунной дисфункцией. Применение МСК при лечении СД 1 типа, так и СД 2 типа патогенетически оправдано.

Цель: оценить эффективность трансплантации МСК КМ у пациентов с СД 2 типа.

Методика. Было включено 20 пациентов с СД 2 типа, с анамнезом более десяти лет. Уровень глюкозы натощак у пациентов составлял 7,15 мг/дл, а через 2 часа после еды уровень глюкозы — 15,32 мг/дл. Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) — 7,9%.

Трансплантация МСК КМ проведена пациентам двукратно с интервалом в 6 мес. МСК в среднем

121×10^6 разбавляли в 250 мл 0,9% NaCl и трансплантировали внутривенно.

Уровень глюкозы натощак и через 2 часа после еды, а также HbA1c проводили до трансплантации и через 3, 6 и 12 мес. В течение всего исследования, пациенты принимали те же лекарственные препараты.

Результаты. После 1 трансплантации МСК КМ, уровень глюкозы снизился и продолжал снижаться до 3 мес. у всех пациентов исследуемой группы. Уровень HbA1c снизился через 6 мес. после трансплантации.

Через 3 мес. после МСК КМ с медикаментозным лечением, уровень глюкозы натощак и уровень HbA1c незначительно изменились, с 7,15 мг/дл до 6,9 мг/дл и с 7,6% до 8,0% соответственно. Уровень глюкозы в крови через 2 ч после еды сильно снизился с 15,3 мг/дл до 10,9 мг/дл.

Через 6 мес. после МСК КМ все 3 показателя (уровень глюкозы в крови натощак, уровень глюкозы в крови через 2 часа после еды и уровень HbA1c) были значительно снижены. Уровень глюкозы в крови натощак с 7,15 мг/дл до 5,9 мг/дл, уровень глюкозы в крови через 2 часа после еды с 15,3 мг/дл до 9,8 мг/дл и уровень HbA1c — с 7,9% до 6,9% гемоглобина.

Через 6 мес. после МСК КМ уровни глюкозы в крови натощак были стабильными. Значения были на уровне 6,0 мг/дл (на 12-м месяце) по сравнению с 5,9 мг/дл (на 6 месяце). Аналогично, глюкоза крови через 2 ч после еды была стабильной на уровне 10,8 мг/дл (на 12 месяце) по сравнению с 6 месяцем. Уровень HbA1c снизился с 6,9% (на 6 месяце) до 6,7% (на 12 месяце). В течение 12 мес. наблюдения и лечения никаких побочных эффектов не наблюдалось.

МСК КМ регулируя иммунные и восстановительные процессы, позволили снизить уровень глюкозы в крови и уменьшить дозу инсулина.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ПУПОВИНЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ CD4+ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Яна Маратовна Байзынова¹, Руслан Вячеславович Николаев¹, Екатерина Николаевна Балашова², Елена Юрьевна Осипова¹

¹ Лаборатория физиологии и патологии стволовых клеток, НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия;

² Отделение реанимации и интенсивной терапии им. профессора А.Г. Антонова, НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

kana-reyka@yandex.ru

Введение. Области применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) расширяются, необходима стандартизация клеточного продукта (КП), в том числе иммуносупрессивной активности (ИСА).

Цель. Оценить ИСА МСК из ткани пуповины (ТП) доношенных новорожденных и из костного мозга (КМ) здоровых доноров на разных пассажах и после криоконсервации в отношении CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови. Материал и методы. Образцы ТП (n=5) были получены из «НМИЦ АГП» им. В.И. Кулакова. Образцы КМ и периферической крови (n=23) доноров, были получены в «НМИЦ ДГОИ» им. Д. Рогачева. Использовали реагенты производства Miltenyi Biotec. МСК культивировали по стандартной методике с использованием среды

StemMACS MSC Expansion Media. CD4⁺ лимфоциты выделяли с использованием набора CD4⁺ T Cell Isolation Kit. Для анализа ИСА использовали набор MSC Suppression Inspector. CD4⁺ лимфоциты и МСК культивировали в различных соотношениях в течение 5 дней. В «0» день лимфоциты метили CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), концентрация которого при делении снижается, на проточном цитофлуориметре детектировали снижение флуоресценции по каналу FITC. При оценке ИСА доля пролиферирующих лимфоцитов без добавления МСК принимали за 100%, и рассчитывали коэффициент снижения пролиферации (КСП). Результаты: При добавлении на 0 день, МСК КМ 4-го пассажа (п.) снижают пролиферативную активность лимфоцитов при соотношении 1:1 в 2,5 раза, 8:1 в 1,2 раза. Добавление МСК через 72 часа после стимуляции лимфоцитов приводило к такому же снижению пролиферации, как и при добавлении в 0 день (1:1 — КСП=2,3; 8:1 — КСП=1,3). Это объясняет эффективность применения МСК при патологиях, связанных с активацией лимфоцитов. МСК, добавленные после криоконсервации обладают таким же иммуносупрессивным действием, как и сразу после культивирования и следовательно, их можно применять для клеточной терапии с сохранением свойств КП. Так, КСП при 1:1 составил 2,5, а при 8:1 — 1,3. МСК на 10 п. обладает меньшим КСП — 1,9 и 1,1 при 1:1 и 8:1 соответственно. МСК ТП обладают более выраженными иммуносупрессивными действиями. При соотношении 1:1 КСП составил 4,47, что достоверно ($p < 0,05$) выше аналогичного показателя для МСК КМ. Рекомендуется рассмотреть МСК ПК как альтернативу МСК КМ, так как эти клетки легко доступны и обладают выраженной иммуносупрессивной активностью.

Заключение. Определение ИСА МСК, позволяет оценить функциональные свойства КП, предназначенного для клинического применения и оптимизировать протоколы клеточной терапии с использованием МСК.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЕ: ИНТЕГРАЦИЯ ИЛИ ПАРАКРИННЫЙ ЭФФЕКТ?

Владимир Павлович Баклаушев¹, Олег Владимирович Дуров¹, Владимир Анатольевич Кальсин¹, Сергей Владимирович Ким², Евгений Владимирович Гулаев¹, Александр Витальевич Троицкий¹, Jan-Eric Ahlfors³

¹ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия;

² НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия;

³ New World Laboratories, Laval, Canada

serpoff@gmail.com

В эксперименте на макаках-резусах исследовали эффективность трансплантации аллогенных нейральных прогениторных клеток, полученных путем прямого репрограммирования (drNPCs) при травме спинного мозга. Предварительно была разработана модель необратимой спинальной травмы у нечеловекообразных приматов с интраоперационным контролем вызванных потенциалов (ВП), позволяющая получить полный одно-сторонний анатомический перерыв кортикоспинального тракта и заднего столба на уровне Th7-8 (Baklaushev V.P., 2019). В экспериментах на этой модели было обнаружено, что трансплантация 5 млн. drNPCs через 2 недели

после пересечения афферентных и эфферентных путей спинного мозга в течение последующих 12 недель приводит к частичному восстановлению нарушенных функций спинного мозга в виде регресса ипсилатеральной моноплегии и восстановления сомато-сенсорных и моторных ВП. Последующий иммуногистохимический анализ показал, что drNPCs могут сохранять свою мультипотентность в пересаженном спинном мозге не менее 12 недель, мигрируя в зоны образования конусов роста поврежденных аксонов. Нейральная дифференцировка пересаженных drNPCs ни в одном из четырех исследованных случаев зарегистрирована не была. Sox2-позитивные трансплантированные клетки преимущественно обнаруживались в зоне активной регенерации, где они секретировали BDNF, что сопровождалось повышенным уровнем экспрессии синаптофизина клетками хозяина в сером и белом веществе. Полученные данные заставляют пересмотреть концепцию механизма действия трансплантированных нейральных стволовых и (или) прогениторных клеток в которой обязательным условием восстановления поврежденного спинного мозга является интеграция пересаженных клеток в систему передачи нервного импульса.

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МАКРОПОРИСТЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ЕГО СОПОЛИМЕРОВ С ОЛИГОЛАКТИДАМИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

**Т.В. Балабанова¹, А.Г. Сальникова^{1,2},
М.Г. Дроздова¹, Т.С. Демина³, Н.А. Сажнев⁴,
Н.Р. Кильдеева⁴, Е.А. Марквичева¹**

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

² ФГБУН Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;

³ ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия;

⁴ ФГБУН Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, Россия

balabanovatv88@gmail.com

Хитозан — это биodeградируемый полисахарид, представляющий интерес для регенеративной медицины. На его основе могут быть получены нецитотоксичные матриксы, поддерживающие биоадгезию и пролиферацию клеток. Кроме того, такие матриксы можно легко модифицировать по аминокетогруппам хитозана и, таким образом, создавать композитные подложки с заданными физико-химическими свойствами, что позволяет расширить возможности их применения и улучшить механические характеристики хитозана.

Цель работы — получение полимерных матриксов в виде пленок (2D) и макропористых гидрогелей (3D) на основе хитозана, изучение их структуры, физико-химических свойств, а также роста и дифференцировки клеток на/в них в модели *in vitro*. Сополимеры хитозана [ММ 60 кДа, СД 0.9] с (L,L-) или (L,D-) олиголактидами [ММ 5кДа] получали ранее разработанным авторами методом твердофазного синтеза (T.S. Demina et al. *Polymers*, 2017; 9(7): 302). На модельных клетках линии фибробластов мыши (L929) с помощью МТТ-теста было показано отсутствие цитотоксичности экстрактов, полученных из данных материалов. С помощью световой микроскопии показано, что пленки на основе исследуемых

сополимеров поддерживают адгезию фибробластов L929 и мезенхимальных стромальных клеток (МСК). При использовании конфокальной микроскопии определили, что гидрогели обладают взаимосвязанной системой макропор (ср. размер 150–200 мкм). Гидрогели поддерживали пролиферацию L929 клеток при их длительном культивировании (МТТ-тест). Дифференцировка МСК на плечных материалах была оценена по активности щелочной фосфатазы. Значение ферментативной активности было выше контрольного (монослойная культура клеток) во всех исследуемых образцах, что позволяет предположить положительное влияние состава матрикса на остеогенную дифференцировку.

Таким образом, гидрогели являются перспективными биоматериалами для регенеративной медицины.

РЕАКЦИЯ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ИНТИМЫ АРТЕРИЙ НА АНГИОТЕНЗИН II И ИХ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Александр Владимирович Балацкий^{1,3}, Пётр Алексеевич Тюрин-Кузьмин², Владимир Сергеевич Попов², Мария Николаевна Балацкая², Наталья Игоревна Калинина², Всеволод Арсеньевич Ткачук¹⁻³

¹ Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

balatsky@fbm.msu.ru

Несмотря на большое количество исследований атеросклероза в настоящее время полностью предотвратить его развитие не удаётся. Существуют данные о возможной роли в инициации атерогенеза субэндотелиальных прогениторных клеток (ПК) мезенхимного происхождения, однако свойства этих клеток изучены недостаточно. Новые данные могли бы объяснить мозаичность атеросклеротических поражений — преимущественное их развитие в изгибах и бифуркациях артериального русла, а также открыть возможности для клеточной терапии атеросклероза.

Иммунофенотип ПК интимы крупных сосудов изучен мало, что затрудняет их идентификацию. Мы предположили, что такие клетки могут соответствовать перицитам, поскольку перициты формируют скопления под эндотелием и обладают, в частности, способностью аккумулировать липиды. Для проверки этого предположения у мышей C57BL/6 дикого типа или несущих ген GFP под промотором нестина выделяли участки аорты от сердца до почечных артерий, замораживали для изготовления срезов или окрашивали целиком. Для окраски использовали антитела к маркерам перицитов: NG2, CD146, рецептору лептина и PDGFRbeta, а также антитела к eGFP и к CD31. Мы обнаружили, что в бифуркациях аорты и ее ветвей, а также в устьях мелких сосудов расположены ПК, несущие маркеры NG2, CD146 и PDGFRbeta. В то же время было продемонстрировано, что клетки, экспрессирующие нестин и рецептор лептина в субэндотелиальном слое отсутствуют, локализуясь, в основном, в периваскулярной жировой ткани. При помощи проточной цитометрии было показано, что число ПК в аорте мышей увеличивается с возрастом, и к 18 неделям составляет до 20% от общей популяции.

Также неясно, каким именно образом ПК интимы могут провоцировать развитие атеросклероза. Ранее в нашей лаборатории было показано, что среди ПК существует популяция, отвечающая повышением уровня внутриклеточного кальция и секрецией микровезикул на повторное воздействие ангиотензина II, мощного атерогенного фактора. При помощи визуализации кальциевого ответа в отдельных клетках с последующей иммуноцитохимической идентификацией ответивших клеток мы показали, что ПК интимы реагируют на ангиотензин II повышением внутриклеточного кальция.

Таким образом, в типичных местах атерогенеза субэндотелиально располагается популяция ПК мезенхимного происхождения. Эти клетки реагируют на ангиотензин II и могут провоцировать развитие атеросклероза.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00429 и грантом Евразийской ассоциации терапевтов.

ОРТОТОПИЧЕСКАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ДЕВИТАЛИЗОВАННОГО МАТРИКСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ ТРАХЕИ: IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЕ

Максим Витальевич Баясин¹, Денис Станиславович Барановский², Илья Дмитриевич Клабуков¹, Анна Гасымовна Демченко¹, Алексей Леонидович Файзуллин¹, Ольга Андреевна Красильникова¹, Михаил Евгеньевич Крашенинников¹, Алексей Валерьевич Люндуп¹, Владимир Дмитриевич Паршин¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² Университетский госпиталь Базеля, Базель, Швейцария

max160203@gmail.com

Цель: изучить биосовместимость и эффективность применения тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе девитализированного трахеального матрикса (ДТМ), заселенного сингенными мезенхимальными стромальными клетками, для восстановления поврежденной трахеи в эксперименте на кроликах.

Материалы и методы: Выделялись сингенные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) и сингенные эпителиоциты легкого кролика. Морфологию и фенотип культуры МСК КМ подтверждали иммунофлюоресцентным окрашиванием на маркеры CD90 и CD271. Клетки легочного эпителия, полученные методом энзиматической обработки измельченной ткани легкого, окрашивались на маркеры СКРan, СК8/18 и СК14. Девитализация донорской трахеи проводилась тремя последовательными циклами замораживания-оттаивания. Двухслойное заселение ДТМ клетками выполняли в условиях статического и динамического культивирования. Проведена ортотопическая имплантация ТИК кроликам (n=2) на место трахеального дефекта переднебоковой стенки, сформированного в результате резекции на протяжении четырех колец. Оценка результатов выполнялась методами компьютерной томографии, гистологического и иммуногистохимического анализов.

Результаты. Получен трахеальный имплантат в виде ТИК на основе ДТМ с двухслойным заселением культурами МСК КМ и эпителиоцитов кролика. Через 3 мес.

после имплантации отмечалось приживление ТИК, стенозирования стенки трахеи не наблюдалось, однако отмечалось незначительное сужение просвета в области имплантации. Через 6 мес. после имплантации биосовместимость тканеинженерной конструкции подтверждалась гистологическим методом. Показана эпителизация и васкуляризация стенки трахеи, отсутствие признаков гнойного воспаления и асептического некроза.

Заключение. Разработанная ТИК на основе ДТМ, двухслойно заселенного эпителиоцитами легкого и МСК КМ, была успешно применена для замещения непротяженных дефектов трахеи в эксперименте *in vivo*. Показана высокая степень биосовместимости материала ДТМ и физиологическая совместимость имплантата ТИК.

Настоящая работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии Минобрнауки РФ № 14.614.21.0001 (RFMEFI61417X0001).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ БИОПОЛИМЕРНОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА

Наталья Владимировна Баранова, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Анна Сергеевна Пономарева, Евгений Абрамович Немец, Виктор Иванович Савастьянов

ФГБУ НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, Россия

BarnatS@yandex.ru

Созданию биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) препятствуют проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности функционально активных изолированных островков Лангерганса (ОЛ). Сохранению структуры и функции ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo* способствуют матриксы — биомиметики внеклеточного матрикса (ВКМ), обладающие свойствами, характерными для нативного микроокружения ПЖ. К таким биомиметикам ВКМ относятся биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ матрикс) и тканеспецифический матрикс из децеллюляризованной ПЖ (ДПЖ матрикс).

Цель работы: провести сравнительный анализ влияния БМКГ матрикса и ДПЖ матрикса на секреторную функцию изолированных ОЛ крысы в процессе их культивирования.

Материалы и методы. ОЛ крысы изолировали, используя модификацию коллагеназной методики. ДПЖ матрикс получали в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ в растворе додецилсульфата натрия в дистиллированной воде и фосфатном буфере с применением ротационной системы. Изолированные ОЛ культивировали в стандартных условиях в суспензионной культуре — контрольная группа, в присутствии БМКГ матрикса — опытная группа I и в присутствии ДПЖ матрикса — опытная группа II. Содержание базальной концентрации инсулина в культуральной среде определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа и ридера для микропланшетов.

Результаты исследования. На первые сутки культивирования концентрация инсулина в опытных группах I и II была выше на 26,2% (258,6 $\mu\text{E}/\text{mL}$) и на 48,7%

(304,9 $\mu\text{E}/\text{mL}$) по сравнению с контрольной группой (205,1 $\mu\text{E}/\text{mL}$), на третьи сутки инкубации — на 62,1% (149,0 $\mu\text{E}/\text{mL}$) и 102,9% (186,5 $\mu\text{E}/\text{mL}$), соответственно, по сравнению с контрольной группой (91,9 $\mu\text{E}/\text{mL}$). На шестые сутки наблюдали еще большую разницу (249,6% и 373,6%) между концентрациями инсулина опытных групп I (102,1 $\mu\text{E}/\text{mL}$) и II (138,3 $\mu\text{E}/\text{mL}$) и контролем (29,2 $\mu\text{E}/\text{mL}$). На 8–10 сутки инкубации сохранившиеся ОЛ контрольной группы не были обнаружены и культуральную среду не исследовали. На этих сроках в опытных группах концентрация инсулина практически оставалась неизменной: группа I — 93,7 $\mu\text{E}/\text{mL}$, группа II — 126,9 $\mu\text{E}/\text{mL}$, при этом уровень секреции инсулина в группе II был на 35,5% выше, чем в группе I. **Вывод.** БМКГ матрикс и тканеспецифический ДПЖ матрикс способствуют не только сохранности изолированных ОЛ, но и пролонгированию их секреторной способности в течение 10 дней. Показано преимущество применения ДПЖ матрикса по сравнению с БМКГ матриксом при создании биоинженерной конструкции ПЖ.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МИКРОРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕДИАТОРЫ АНТИФИБРОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Наталья Андреевна Басалова^{1,2}, Георгий Дмитриевич Сагарадзе¹, Михаил Спартакевич Арбатский², Ольга Александровна Григорьева¹, Иван Константинович Зайцев², Евгений Геннадьевич Евтушенко³, Наталья Игоревна Калинина², Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}

¹ *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

² *Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

³ *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

natalia_ba@mail.ru

Фиброз — патологическое увеличение в тканях доли стромального компонента, возникающее в ходе репаративной регенерации после обширных повреждений или хронического воздействия повреждающих агентов. Для предотвращения потери функциональности ткани и восстановления ее нормальной архитектуры необходим поиск подходов к подавлению и реверсии фиброза.

Перспективным инструментом для решения этой задачи могут считаться мезенхимные стромальные клетки (МСК), способные подавлять фиброгенез за счет действия секретлируемых растворимых факторов (РФ) и внеклеточных везикул (ВВ). Однако остаются почти не исследованными эффекты МСК в отношении реверсии фиброза. Поэтому мы изучили возможные механизмы влияния МСК на дедифференцировку миофибробластов, которые являются ключевыми участниками фиброгенно-го прогресса.

Ранее нами было показано, что как РФ, так и ВВ, секретлируемые МСК жировой ткани человека, ингибируют TGF β -индуцированную дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*. Однако только ВВ способствовали практически полной реверсии дифференцировки миофибробластов. Для того, чтобы установить потенциальные механизмы этого эффекта, состав ВВ оценили методом РНК-секвенирования.

Мы обнаружили, что ВВ содержат спектр регуляторных РНК, включая длинные некодирующие РНК (лсРНК) и микроРНК (миРНК). Из 270 выявленных миРНК 52 имели мишени, связанные с регуляцией фиброза.

Для выяснения роли отдельных миРНК, которые могут быть медиаторами влияния МСК на развитие фиброза, были выбраны потенциально профиброгенная миРНК-21 и антифиброгенные миРНК-29 и 129. Для данных миРНК смоделировали гиперэкспрессию или подавление экспрессии методом трансфекции ВВ синтетическими нуклеотидными последовательностями. Подавление экспрессии миРНК-21 приводило к уменьшению доли клеток с морфофенотипом миофибробластов в культуре. При этом подавление экспрессии миРНК-29 или 129 увеличивало это число и активировало экспрессию профибротических генов, таких как α -гладкомышечный актин и EDA-фибронектин. Гиперэкспрессия исследуемых миРНК не вносила вклада в свойства ВВ.

Таким образом, можно предположить, что МСК через секретлируемые ВВ способствуют дедифференцировке миофибробластов в фибробласты. Одним из механизмов этого явления и антифибротического эффекта МСК в целом может быть регуляция баланса между профиброгенными и антифиброгенными миРНК в составе секретлируемых ВВ.

Исследование проводилось при поддержке РФФИ № 18-015-00525 с использованием биоматериалов проекта Московского университета «Ноев ковчег».

СОЗДАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ НА ОСНОВЕ МИКРОНИЗИРОВАННОГО ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МАТРИКСА СУСТАВНОГО ХРЯЦА СВИНЬИ

Юлия Борисовна Басок, Алексей Михайлович Григорьев, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Евгений Абрамович Немец, Александра Дмитриевна Кириллова, Виктор Иванович Севастьянов

Отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

bjb2005@mail.ru

Тканеинженерные конструкции (ТИК), предназначенные для лечения дефектов хряща, включают, как правило, аутологичные хондроциты или мезенхимальные стромальные клетки (МСК), культивированные на биосовместимых трехмерных матриксах. Наиболее перспективным матриксом представляется децеллюляризованная ткань, обладающая тканеспецифическими свойствами, т. е. способностью избирательно поддерживать адгезию и пролиферацию клеток конкретной ткани или органа. Отметим, что микронизированная форма носителя позволяет обеспечить наименее инвазивный инъекционный способ введения.

Целью работы было формирование *in vitro* и исследование ТИК хряща, включающей микронизированный тканеспецифический децеллюляризованный матрикс суставного хряща свиньи (МТДМ СХс) и МСК жировой ткани человека (ЖТч).

Материалы и методы. Микродисперсные частицы хряща (размер частиц 100–220 мкм) получали в криомельнице CryoMill (Retch GmBH, Германия). Для

децеллюляризации образцов использовали комбинацию 3 циклов замораживания/оттаивания (–196°С/37°С) и обработки поверхностно-активными веществами (додецилсульфатом натрия, Тритоном X-100) и ДНКазой. Каждая ТИК включала 10 мг МТДМ СХс и 2×10^6 МСК ЖТч. Первые 5 суток биоинженерные конструкции культивировали в ростовой культуральной среде, далее ее заменяли на дифференцировочную среду. Жизнеспособность клеток оценивали методом флуоресцентного окрашивания витальным красителем Live/Dead Assay. Морфологию ТИК оценивали с использованием гистологических методов окрашивания.

Результаты исследования. К 14 суткам культивирования ТИК в хондрогенной среде визуализировали активный рост клеток с образованием многослойных участков, сопровождающийся наработкой ими внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ содержал специфичные для хрящевой ткани компоненты, гликозаминогликаны (ГАГ) и коллаген — образцы локально позитивно окрашивались альциановым синим и по методу Массона. В процессе культивирования клетки и синтезированный ими ВКМ образовывали с микрочастицами МТДМ СХс единый плотный конгломерат. На 26 сутки эксперимента в ВКМ наблюдали равномерное распределение коллагена и усиление интенсивности окрашивания на ГАГ. В образцах происходила клеточная резорбция МТДМ СХс.

Выводы. Показанная способность полученного по разработанному протоколу МТДМ СХс поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч свидетельствует о его потенциале для использования в регенеративной медицине хряща.

Работа выполнялась при частичном финансировании гранта РФФИ № 16-29-07322.

ВЗАИМОВЛИЯНИЕ NOTCH-VEGFR-ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ КАПИЛЛЯРОПОДОБНЫХ СТРУКТУР В 2Д МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Ирина Борисовна Белоглазова¹, Екатерина Сергеевна Зубкова¹, Константин Владимирович Дергилов¹, Елизавета Израилевна Ратнер¹, Евгений Константинович Шевченко¹, Елена Викторовна Парфенова^{1,2}

¹ *ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;*

² *МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия*

irene.beloglazova@gmail.com

Ангиогенез является сложным многоэтапным процессом, включающим в себя ряд скоординированных событий, таких как миграция эндотелиальных клеток (ЭК), ремоделирование внеклеточного матрикса (ВМ) и взаимодействие ЭК с муральными клетками, стабилизирующими сосуд, сформированный *de novo*. Данное взаимодействие включает в себя как взаимное паракринное воздействие, так и прямые межклеточные контакты.

В данной работе мы использовали 2Д модель сокультивирования ЭК пупочной вены человека и мезенхимальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТ). Мы обнаружили, что сокультивирование в плотности 630 тыс. клеток на см² и соотношении 1:3 (ЭК:МСК ЖТ) привело к формированию капиллярно-подобных структур (КПС) эндотелиальными клетками. При этом происходило

значительное изменение в профиле экспрессии генов в обоих типах клеток. В ЭК повышалась экспрессия мРНК VEGFR2 и uPAR в 2 раза, а в МСК ЖТ урокиназы и ряда белков внеклеточного матрикса. Кроме того, значительным образом менялась экспрессия мРНК белков Notch сигналинга. Добавление антител к субъединице интегрин-аv (рецептор белка BM — витронектина) полностью подавляло формирование КПС, а в монокультуре ЭК приводило к повышению уровня экспрессии мРНК таких участников Notch сигналинга как Dll4, Jagged1, Notch-1, Notch-4, а также VEGFR1 и неинтегринового рецептора витронектина — uPAR, который является также рецептором внеклеточной протеазы — урокиназы, принимающей активное участие в ремоделировании BM. Добавление селективного ингибитора VEGFR2 приводило к ингибированию формирования КПС, однако на монокультуре ЭК применение данного ингибитора значительно не меняло экспрессию генов Notch сигналинга, урокиназной системы или VEGFR 1 или 2. Ингибитор γ -секретазы (компонент Notch сигналинга) подавлял формирование КПС, а в монокультуре ЭК снижал экспрессию мРНК Dll4, и не оказывал значительного влияния на экспрессию мРНК VEGFR 1 и 2 или урокиназной системы.

Полученные результаты свидетельствуют о взаиморегуляции таких систем как Notch, VEGF и BM в процессе формирования новых сосудов клетками эндотелия и МСК, что необходимо учитывать при разработке технологий получения васкуляризированных тканеинженерных конструкций.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-015-00511.

ОЦЕНКА РОЛИ КОНТАКТНОГО ОКРУЖЕНИЯ КАК ФАКТОРА ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ АДИПОЦИТОВ

Майя Борисовна Белякова, Анастасия Васильевна Панова, Михаил Витальевич Черноурцкий, Наталья Валериевна Костюк, Михаил Владимирович Миняев, Джулианна Викторовна Лещенко

Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

mayabe@yandex.ru

Мультиметные клетки жировой ткани — МСК и ДЖК (дифференцированные жировые клетки) — дифференцируются *in vitro* в различных направлениях как под влиянием специфических индукторов, так и под воздействием изменения концентраций нутриентов в средах, причем успешно без фетальных сывороток. Традиционный протокол ферментативной дезинтеграции ткани целиком нарушает природную нишу клеток, что затрудняет оценку, какие именно факторы микроокружения клеток тормозят проявление ими мультиметных свойств в ткани. Предположив, что наиболее значимыми являются градиенты растворимых веществ, мы смоделировали сохранение клеточных контактов и тканевого матрикса, используя в эксперименте экспланты жировой ткани.

Целью исследования было оценить значение сохранения контактного окружения клеток жировой ткани как фактора дедифференцировки адипоцитов и миграции.

Для этого экспланты жировой ткани крыс и кроликов помещались в среды с BS на основе DMEM или DMEM/F12, получившиеся в результате миграции колонии гистохимически тестировали на мультиметность с применением традиционных индукторов адипогенного и остеохондрогенного

направлений; результаты сравнивали с популяциями МСК-ЖТ, полученных обычным способом выделения, и ДЖК, выделенных в «потолочной» культуре.

Микроскопией и липофильным окрашиванием показано, что собственно адипоциты начинают дедифференцироваться непосредственно в экспланте жировой ткани и мигрируют из него, меняя морфологию и избавляясь от липидных капель за 1–3 дня (в зависимости от обедненности среды глюкозой). Миграция новых клеток может продолжаться 2–4 недели, при этом в экспланте визуализируются разрыхляющиеся зоны с существенным снижением количества сферических клеток и скоплением мелкокапельных ДЖК. После 1–3 пассажей популяции показали способность к индуцированной дифференцировке на адипогенез, хондрогенез и остеогенез, причем частота появления клеток таких типов, как и наработка коллагена, не отличалась от чашек, засеянных в аналогичные среды клетками из культур МСК-ЖТ того же животного, а также ДЖК, полученных «потолочным» культивированием.

Таким образом, мультиметные клетки жировой ткани легко могут быть получены культивированием ее эксплантов, мультиметность мигрировавших клеток при этом аналогична ДЖК и МСК, полученных ферментативным выделением, подтверждая гипотезу, что трансдифференцировка инициируется изменением концентрации растворимых молекул, составляющих компоненты клеточной ниши, с возможным участием локальных тканевых факторов.

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК В 3D-СИСТЕМАХ

Полина Юрьевна Бикмулина¹, Настасья Владимировна Кошелева^{2–4}, Анастасия Иосифовна Шпичка¹, Владимир Исаакович Юсупов⁵, Владимир Георгиевич Гогвадзе^{6,7}, Петр Сергеевич Тимашев^{1,5,8}, Юрий Алексеевич Рочев^{1,9}

¹ *Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия;*

² *Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;*

³ *Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

⁴ *ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;*

⁵ *Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;*

⁶ *Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

⁷ *Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;*

⁸ *Отдел полимеров и композиционных материалов, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия;*

⁹ *National University of Ireland, Galway (NUI Galway), Galway, Ireland*

Polina_Bikmulina@mail.ru

В настоящее время применение различных скаффолдов с иммобилизованными в них клетками для получения тканеинженерных продуктов и трансплантации является одним из наиболее распространенных подходов в регенеративной медицине. Однако данный метод имеет ограничения в связи с гибелью клеток внутри конструкций из-за недостатка кислорода, питательных веществ,

отсутствия васкуляризации. Одним из многообещающих подходов для устранения этих проблем является фотобиомодуляция (ФБМ). Данный метод основан на низкоинтенсивном облучении клеток, во многих случаях активирующем их пролиферацию, метаболизм и дифференцировку. Основной мишенью красного и ближнего инфракрасного света является дыхательная цепь митохондрий, однако до сих пор не изучены процессы запуска того или иного ответа клетки на ФБМ. Целью работы стал анализ влияния ФБМ в красном и инфракрасном диапазонах на физиологическую активность клеток в 2D и 3D культурах.

Для выяснения эффектов ФБМ в различных условиях были использованы 2 типа клеток человека с различным метаболизмом — первичная культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и линия клеток нейробластомы SK-N-BE(2), применяли облучение в красном (633 нм) и ближнем инфракрасном (840 нм) диапазонах. В 2D культурах ФБМ активировала дыхательную цепь, что выражалось в обращении ингибирующего действия ротеона. Трёхмерные условия культивирования были созданы при помощи инкапсуляции клеток в модифицированный фибриновый гидрогель. Было подтверждено, что при помещении в 3D систему жизнеспособность и пролиферация клеток снижалась в среднем на 20%. ФБМ, особенно свет инфракрасного диапазона, в 3D-системе возвращала жизнеспособность клеток к контрольным значениям в 2D культурах, повышая активность митохондрий на 10–15%.

Таким образом, было показано, что ФБМ красным и инфракрасным облучением увеличивает метаболическую активность за счет активации дыхательной цепи митохондрий, стимулирует пролиферацию и выживаемость клеток. Инфракрасное облучение имеет более выраженные эффекты в трехмерных системах. За счет своего удобства и эффективности данный подход может найти широкое применение в тканевой инженерии, в частности, для прекондиционирования клеток в скаффолдах перед трансплантацией.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 15-15-00132, анализ метаболизма и жизнеспособности) и РФФИ (№ 17-02-01248 и № 17-02-00832, ФБМ).

ВЛИЯНИЕ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ АФК НА ИММУНОМОДУЛЯТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Полина Ивановна Бобылёва

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Россия

blastoblast@gmail.com

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) по результатам ряда доклинических и клинических исследований считаются эффективными для терапии аутоиммунных заболеваний. Однако гетерогенность МСК, затрагивающая, как уже показано, пролиферативную, колониюобразующую активность МСК, дифференцировочный потенциал, уровень АФК, создаёт сложности для их применения. На текущий момент малоизученным остаётся вопрос о влиянии особенностей функционального состояния МСК на иммуномодуляторные свойства.

Данное исследование направлено на выявление связи регуляции функций МСК, сопряжённой с изменением уровня АФК, и метаболической и иммуномодуляторной активности МСК в процессе взаимодействия с активированными аллогенными иммунными клетками. Предварительные тесты показали повышение уровня

АФК в МСК при праймировании их ИФН- γ в течение 16 ч, а также снижение уровня АФК при инкубации с антиоксидантом N-ацетил-L-цистеин (НАС). Далее МСК, прекондиционированные с ИФН- γ либо НАС, в течение суток сокультивировали с ФГА-стимулированными аллогенными мононуклеарами периферической крови (МНК) при разделении полупроницаемой мембраной трансвелл. Окрашивание специфическими флуоресцентными зондами выявило, что МНК стимулировали повышение уровня АФК в МСК, при этом предобработка ИФН- γ сходно с НАС могла ослаблять этот эффект. Наблюдалась тенденция к снижению трансмембранного потенциала митохондрий под воздействием МНК, чему также способствовало прекондиционирование с НАС. Метаболическая активность МСК, оцененная по способности восстанавливать краситель Alamar Blue, практически не менялась. Праймирование ИФН- γ , а также взаимодействие с МНК приводило снижению объёма эндосомального компартмента. Прекондиционирование МСК, регулирующее уровень АФК, не влияло на способность модулировать экспрессию маркеров активации CD25, CD69 на МНК. А при взаимодействии МНК с ИФН- γ -праймированными МСК наблюдалось некоторое повышение экспрессии HLA-DR. Регуляция МСК при помощи ИФН- γ и НАС приводила к небольшому снижению способности ингибировать пролиферацию и индуцировать гибель активированных МНК.

Таким образом, направленная регуляция уровня АФК в МСК вызывает изменение эндосомального компартмента, активности митохондрий, а также регулирует иммуномодуляторную активность МСК при взаимодействии с аллогенными активированными МНК.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации МК-2976.2018.4.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ИЗМЕНЁННЫМ ГЕНЕТИПОМ КУЛЬТУРЫ ИМСК ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ХРЯЦЕВОЙ ТКАНИ СУСТАВОВ

Михаил Сергеевич Божокин^{1,3}, Светлана Анатольевна Божкова¹, Даниил Валерьевич Качкин², Алесандр Анатольевич Рубель², Юлия Викторовна Сопова², Юлия Александровна Нащёкина³, Миральда Ивановна Блинова³, Михаил Георгиевич Хотин³

¹ РНИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия; ³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

writeback@mail.ru

Гиалиновый хрящ представляет собой аваскулярную соединительную ткань суставной поверхности состоящей преимущественно из воды и белков внеклеточного матрикса. Он способен выдерживать большие механические нагрузки и обратимо деформироваться, но обладает низким регенеративным потенциалом.

Перспективным направлением медицины является трансплантация на место повреждения хряща клеточно-инженерной конструкции (КИК) состоящей из биодеградируемой мембраны и помещённых в неё генетически модифицированных аутологических клеток (мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (ИМСК), хондроцитов и др.) с активацией синтеза белков внеклеточного матрикса. Одним из вариантов такой модификации клеток

является их трансфektion плазмидой, несущей ген *tgfb3* — одного из важнейших индукторов хондрогенеза.

Целью исследования стало создание КИК с использованием генетически активированных мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) и биодеградируемой полилактидной мембраны для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща.

Материалы и методы. Биодеградируемую мембрану синтезировали из полимолочной кислоты. ММСК выделяли из бедренных костей половозрелых крыс и культивировались до 3 пассажа при 37°C и 5% CO₂. Трансфекция осуществлялась с помощью электропоратора созданной рекомбинантной плазмидой на основе вектора pEGFP-N3 и содержащий вставку гена *tgfb3* и флюоресцентный маркер. Совмещение культуры клеток и мембраны происходило динамическим способом с помощью разработанного и запатентованного устройства (Ru 2019 104 31 1), а оценка результата происходила с помощью методики сканирующей электронной микроскопии и гистологическими методами.

Результаты. По результатам анализа методом точной цитометрии было подтверждено принадлежность используемых клеток к ММСК. С помощью секвенирования и гель-электрофореза была подтверждена последовательность и наличие вставки в созданной плазмиде. При оценке трансфektionированных клеток было обнаружено скопления клеточных агрегатов с флюоресцентной светимостью, что подтверждает трансфektionирование клеток и действие белка на культуру клеток. Устройство по заселению КИК позволило подтвердить наличие клеток как на её поверхности, так и внутри инженерной конструкции.

Выводы. Разработана КИК, состоящая из культуры ММСК синтезирующих важнейший индуктор хондрогенеза — цитокин Tgfb3 и биодеградируемого носителя. Планируется трансплантация конструкции в область дефекта гиалинового хряща экспериментального животного с оценкой результата в динамике.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ТКАНЕВЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПЛАЦЕНТЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦАМИ МЕДИ: ОЦЕНКА РОЛИ ФОСФОРИЛИРУЮЩИХ ТИРОЗИНАЗ — БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ГЕНА SRC

Дмитрий Александрович Боков¹, Дмитрий Александрович Горьков², Андрей Александрович Слободсков³, Светлана Викторовна Нотова⁴

¹ Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва, Россия;

³ Городская клиническая больница № 2, Оренбург, Россия;

⁴ Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, Оренбург, Россия

cells-tissue.bokov2012@yandex.ru

Экспрессия гена SRC в дефинитивных тканях является онкогенным фактором. Доказана её роль в индукции колоректального рака, рака молочных желёз, головного мозга и др. Фосфорилирующие тирозиназы SRC — элементы внутриклеточной машинерии, поддерживающей высокий уровень пролиферации, выживаемость, высокие адгезивные возможности поверхности клеток. Белковые продукты гена SRC модулируют рецепторы к цитокинам пролиферации, дифференцировки, интеграции клеток.

Перспектива использования новых биомедицинских материалов, в том числе, наноструктурированных веществ, требует их всестороннего биотестирования с анализом нового диапазона параметров трансформации биологических тканей и сохранения их детерминированных гистогенетических свойств.

Целью работы стала проверка гипотезы о регуляторной роли гена SRC в активно перестраивающихся тканях плаценты, в том числе, и после их повреждения наночастицами меди.

Работа выполнена в группе самок крыс Wistar (N=30), которым после наступления беременности каждые три дня, вплоть до 18 суток, в бедренную группу мышц вводили по 2 мл взвеси наночастиц меди с концентрацией 1,0 мл/кг. Наночастицы имели размер 102±2,0 нм. Наноструктурированное вещество получено в Институте химической физики РАН. Активность гена определяли по накоплению в клетках его белковых продуктов, выявляемых с помощью моноклональных антител.

Введение наночастиц обусловило нарушение хода развития плаценты и дифференцировки её тканевых элементов. Сохранялись значительные по объёму (до 10%) участки незрелого трофобласта; на 50% снижался диаметр терминальных балок; на 20% снижался объём лабиринта; резко возрастал объём межбалочного пространства (на 15%). Появлялись зоны некроза и расплавления балок. В балках регистрировалось прекращение фетального кровотока и спадение гемокапилляров. При этом, почти в три раза возрастал объём симпластических почек и была продемонстрирована индукция новообразования терминальных балок. Это свидетельствовало об активации компенсаторно-пластических процессов. В хориональном эпителии формирующихся балок и в местах его утолщения определялось высоко интенсивное накопление метки маркера. Напротив, клетки трофобласта и децидуальной ткани были SRC-негативными. В ещё большей степени экспрессия гена SRC определялась в мезенхиме хориоаллантоидной пластинки и эпителии желточного мешка.

Полученные данные свидетельствуют о регуляторном значении гена SRC компенсаторно-пластических процессов в плаценте при повреждении её тканей наночастицами меди.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГИПЕРПРОДУЦИРУЮЩИХ ФАКТОР РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ (HGF) МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ВИДЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ЭФФЕКТИВНО СТИМУЛИРУЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ КОНЕЧНОСТИ МЫШИ

М.А. Болдырева¹, Ю.Д. Молокотина¹, Е.К. Шевченко¹, И.Б. Белоглазова¹, Е.С. Зубкова¹, К.В. Дергилев¹, П.И. Макаревич^{2,3}, Е.И. Ратнер¹, Е.В. Парфенова¹

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

mboldyreva@inbox.ru

Клеточная терапия, основанная на использовании мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (МСК), — интенсивно развивающаяся технология стимуляции ангиогенеза и регенерации при ишемическом

повреждении тканей. При этом крайне актуальной оказывается разработка методов сохранения жизнеспособности и регенеративных свойств клеток после трансплантации. Одним из перспективных подходов может быть использование минимальных тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов, образованных МСК и наработанным ими внеклеточным матриксом, отчасти моделирующих клеточную нишу с поддерживающим микроокружением. Регенеративные эффекты МСК могут быть усилены путем генетической модификации, вызывающей гиперэкспрессию фактора роста с плейотропным влиянием на процессы регенерации. Мы оценили терапевтический эффект МСК жировой ткани (МСК ЖТ), модифицированных аденоассоциированным вирусным вектором, несущими ген фактора роста гепатоцитов (HGF), на модели ишемии задней конечности у мыши. Ангиогенный (плотность сосудов на срезах мышц CD31⁺, α -ГМА⁺) и нейротропный эффекты (количество нервных волокон на срезах мышц, NF200⁺структур) были оценены после трансплантации МСК как в суспензии, так и в виде тканеинженерной конструкции (cell sheets, CS). Восстановление кровотока оценивали по лазерному доплеровскому сканированию в динамике до 21 дня после моделирования ишемии.

Полученные результаты показали, что трансплантация клеток, гиперэкспрессирующих плейотропный фактор роста HGF, ведет к более эффективному восстановлению ишемизированной конечности, включая восстановление кровоснабжения, васкуляризации и иннервации, уменьшение размера некроза мышц и последующего фиброза, чем трансплантация немодифицированных МСК ЖТ. Наибольшая эффективность отмечена при трансплантации МСК ЖТ, гиперпродуцирующих HGF, в виде клеточных пластов. Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты обусловлены плейотропным действием HGF наряду с многофакторным паракринным влиянием самих МСК ЖТ, которые остаются жизнеспособными и функционально активными при их трансплантации в виде клеточных пластов.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-015-00438.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ТЕСТИРОВАНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ НА КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

Виолетта Викторовна Болтовская, Виктория Викторовна Россинская, Ирина Феликсовна Нефедова, Лариса Николаевна Кулагина

Институт экспериментальной медицины и биотехнологий, СамГМУ, Самара, Россия

violetta.boltovskaya@yandex.ru

В настоящее время стандартные протоколы тестирования отсутствуют, каждый исследователь составляет свой план тестирования для каждого конкретного случая. Нами усовершенствован и оптимизирован протокол тестирования *in vitro* изделий медицинского назначения, имеющих металлические детали.

Протестировать целиком готовые изделия, применяемые в травматологии, ортопедии, стоматологии, на культурах клеток невозможно. Образцы, необходимые для исследования изготавливают определенной формы и размеров, структура их поверхности соответствует структуре поверхности самого готового изделия, образцы стерильны.

Первоначальная задача состоит в получении достаточного количества качественных линий клеток, полученных из первичных эксплантатов. Перед исследованием проверяют культуру на жизнеспособность и пролиферативный потенциал (индекс пролиферации, время удвоения, индекс адгезии). Затем приступают непосредственно к тестированию.

Рекомендуемые в ГОСТ ISO 10993, ч. 5 метод прямого контакта используется только для качественной оценки цитотоксичности. Для возможности применения еще и количественных методов, мы предложили использовать 24-луночные планшеты со вставками.

При появлении явной цитотоксичности образцов на первом этапе (окрашивание клеток в синий цвет 0,4% раствором трипанового синего), дальнейшее исследование проводить нецелесообразно. При слабой цитотоксичности и ее отсутствии следующий этап включает комплекс общеморфологических и биохимических методов (МТТ и ЛДГ). При проведении исследования на адгезивную способность клеток к поверхности материала необходимо, чтобы образец полностью закрывал дно лунки в планшете, и суспензия клеток вносилась только на поверхность образца, иначе произойдет потеря клеток и будет получен недостоверный результат.

Предложенный нами протокол показал свою пригодность для тестирования новых изделий медицинского назначения, которые найдут широкое применение в регенеративной медицине.

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА НА ПРОДУКЦИИ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ-21 ЛОКАЛЬНЫХ ЖИРОВЫХ ДЕПО

Дарья Андреевна Бородкина^{1,3}, Юлия Александровна Дылева¹, Ольга Викторовна Груздева^{1,2}, Екатерина Владимировна Белик¹

¹ *Лаборатория исследования гомеостаза, ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия;*

² *ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Россия;*

³ *Областной диабетологический центр Кемеровской области, «Кемеровская областная клиническая больница» им. С.В. Беляева, Кемерово, Россия*

dyleva87@yandex.ru

Цель работы определить особенности продукции фактора роста фибробластов-21 (FGF-21) подкожных, эпикардальных и периваскулярных адипоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца и пороками сердца.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 84 пациента с ишемической болезнью сердца (ИБС) и инфарктом миокарда (ИМ) в анамнезе и 50 пациентов с пороками сердца: 30 человек с врожденными (ВПС, недостаточность аортального клапана) и 20 с приобретенными (ППС, на фоне ревматической болезни сердца, стеноз митрального клапана). Всем пациентам во время планового оперативного вмешательства (аортокоронарного шунтирования (АКШ) или замены клапанов сердца), проводился забор адипоцитов эпикардальной (ЭЖТ) и подкожной жировой ткани (ПЖТ) и периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) (в области маммакоронарного сосудистого пучка, который располагается в переднем средостении — восходящей частью

аорты) с последующим культивированием и получением супернатанта. Со дна лунок аккуратно забирали среду для последующего определения экспрессии гена FGF-21, а также содержания продуктов его экспрессии методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы BioVendor (США). Данные проанализированы с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 9.0.

Результаты: среди пациентов без поражения коронарных артерий не прослеживалось значимой разницы в экспрессии гена FGF-21 во всех трех культурах для адипоцитов. Тогда как среди пациентов с ИБС адипоциты ЭЖТ, характеризовались более низким уровнем экспрессии гена — в 3,3 раза ниже чем в культуре ПЖТ и в 3,11 ниже, чем в культуре ПВЖТ. Исследуемые группы достоверно не различались по уровню экспрессии гена FGF-21 в культурах ПЖТ и ПВЖТ. Данные о секреции FGF-21 соответствовали экспрессии его гена. Так наименьшая концентрация FGF-21 регистрировалась в супернатанте адипоцитов ЭЖТ пациентов с ИБС и была почти в два раза ниже, чем в остальных культурах. Тогда как секреция FGF-21 в супернатанте адипоцитов ПЖТ и ПВЖТ достоверно не различалась, ни между группами пациентов, ни между культурами.

Выводы: Таким образом ЭЖТ у пациентов с ИБС характеризуется подавлением секреции FGF-21 по сравнению с пациентами без поражения коронарных артерий и других жировых депо.

Поисково-аналитическая работа по подготовке рукописи проведена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-75-20026 «Молекулярные маркеры патологической активации жировой ткани при сердечно-сосудистых заболеваниях».

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ПРИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ КОЖИ

Виталий Андреевич Брунчук, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виктория Андреевна Никитина, Ирина Владимировна Кобзева, Юлия Борисовна Сучкова, Дарья Юрьевна Усупжанова, Анна Андреевна Расторгуева, Ольга Александровна Максимова, Валерий Евгеньевич Крючихин, Сергей Владимирович Лищук, Елена Алексеевна Дубова, Константин Анатольевич Павлов, Валентин Андреевич Брумберг, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов

ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

brunya2008@yandex.ru

Изучение регенеративных процессов кожи у лабораторных животных с МЛП при использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК) плаценты человека и концентрата их кондиционированной среды (ПКС).

Моделировали МЛП на рентгеновской установке в дозе 110 Гр, 80 лабораторных животных (самцы Wistar, 8–12 недель, $m=210,0 \pm 30,0$ г) рандомизировали случайным образом на 4 группы (по 20 животных в каждой): контроль (К) — без получения терапии; контроль с введением концентрата культуральной среды (КС); терапия МСК плаценты (Пл); терапия ПКС. Терапию проводили в расчетной дозе 2×10^6 /кг на 1, 14, 21 сутки. Проводили гистологическое и иммуногистохимическое

исследования. Культивировали МСК до 3–5 пассажа, осуществляли забор кондиционированной среды и концентрировали ее в 10 раз. С помощью проточной цитофлюориметрии определяли иммунофенотип МСК и жизнеспособность.

Средняя площадь измененной кожи на 7 день была достоверно ниже в группах К и КС по сравнению с группами Пл и ПКС ($p \leq 0,05$), к 14 дню общая измененная площадь в группах К, Пл и ПКС не различалась, тогда как в группе КС она была меньше до конца эксперимента. С 14 дня эксперимента регистрировали открытую раневую поверхность кожи у всех животных. Динамика уменьшения площади открытой раневой поверхности была одинакова для всех групп до 42 дня исследования. После наблюдали волновую динамику увеличения и уменьшения открытой раневой поверхности во всех группах, кроме КС. На 112 день площадь открытой раневой поверхности в группе ПКС была в 6,7 раз меньше по сравнению с группой К. Полное заживление раневой поверхности кожи в группе КС отмечалось у 40%, в ПКС — 60%, в Пл — 20%, в группе К не произошло заживление раневого дефекта. По данным гистологического исследования отмечали уменьшение воспалительных процессов, наличие зачатков волосяных фолликулов и пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла в ПКС в отличие от других групп, в которых эти изменения были не столь заметны.

Применение концентрата кондиционированной среды МСК плаценты (группа ПКС) при МЛП у лабораторных животных приводит к ускорению перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации. В одной из контрольной групп при применении концентрата культуральной среды (группа КС) наблюдали значимое уменьшение площади раневой поверхности по сравнению с другими группами на протяжении всего периода наблюдения. Однако, анализ гистологического и иммуногистохимического исследований не позволяет однозначно утверждать об эффективности применения данного типа терапии.

РОЛЬ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БИОБАНКОВ: ЦЕЛИ И ФОРМЫ

Елена Владимировна Брызгалкина

Философский факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

evbrz@yandex.ru

Междисциплинарное взаимодействие применительно к биобанкам отличается опережающим развитием технических решений в сравнении с социогуманитарным осмыслением оснований и последствий биобанкинга, что подразумевает сложные кооперационно-координационные связи отдельных исследовательских групп и различный характер целевых ориентиров и форм междисциплинарности.

Философский уровень определяется включенностью биобанков в трансформацию природы человека, дискуссионностью оснований и границ вмешательств в естественную заданность телесной основы человеческого бытия, остротой проблем доступности и справедливости продуктов биобанкинга. Влияние на развитие общества расширяющихся и углубляющихся данных о человеке черевато дискриминационными и стигматизирующими последствиями, что требует анализа заинтересованности различных социальных субъектов в результатах

биобанкинга, изменения отношений к общественному и личному здоровью как благу.

Национально-государственный уровень требует междисциплинарного взаимодействия по проблемам обеспечения государственной безопасности; при разработке и реализации модели государственного регулирования развития фундаментальных и прикладных исследований. Биобанки становятся институтами, интегрирующими тренды развития всех элементов системы «наука-общество». Направления и перспективы влияния результатов работы биобанков на государственные решения разных уровней в сфере здравоохранения, социальной политики, и, возможно, других сферах, должны стать предметом анализа соотношения глобальных, национально-государственных интересов и автономии индивида, соотношения актов солидарности-добровольности и коммерциализации-частного присвоения. Формы междисциплинарного взаимодействия на двух описанных уровнях институционально вынесены за пределы биобанков.

Собственно-научный уровень связан с определением целеполагания биобанка, обоснованием стратегий и форм развития. Он включает выработку понятийного аппарата междисциплинарных исследований, рассмотрения соотношения «часть — целое» при типологизации коллекций и моделировании разного уровня процессов, требует разработки и соблюдения нормативного регулирования деятельности. Формы междисциплинарного взаимодействия на этом уровне заключены в рамки функционирования биобанков (биоэтические комитеты (комиссии)).

Описанное видение целей и форм междисциплинарного взаимодействия не является исчерпывающим, оно быть уточнено и дополнено применительно к конкретным биобанкам с учетом их целевой направленности и уровня.

ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЕ БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ГРАФЕНА

Александр Станиславович Буинов¹, Бато Чингисович Холхоев¹, Ксения Николаевна Бардакова², Эльвира Разитовна Гафарова², Петр Сергеевич Тимашев², Виталий Федорович Бурдуковский¹

¹ Байкальский институт природопользования, Улан-Удэ, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

buinov.aleksandr.96@mail.ru

Восстановление поврежденных тканей, на сегодняшний день, является одной из самых актуальных и важных проблем в современной медицине. Одним из способов решения является использование принципов тканевой инженерии, которые позволяют создать искусственную ткань из собственных клеток пациента. Важная роль при этом отводится скаффолдам, которые необходимы для поддержания роста и дифференциации клеток в процессе реконструкции поврежденной ткани. Для получения скаффолдов используют различные полимеры, одним из которых может выступать хитозан, который возможно комбинировать с различными биоактивными веществами. Для улучшения свойств полимерной матрицы часто добавляют различные наполнители, среди которых одним наиболее перспективных является графен, ввиду его высоких механических характеристик и электропроводности. Таким образом,

целью данной работы являлось получение и изучение свойств биосовместимых электропроводящих композитов на основе хитозана и графена.

Для получения стабильных графеновых дисперсий использовали мультислойный графен. Дисперсии были приготовлены в водном растворе Pluronic F-108 (ПЛУ) с концентрацией 10 мг/мл. Полученные дисперсии применялись с целью получения композитного раствора полимера. Для этого к дисперсиям добавляли хитозан, при этом массовое отношение хитозана к ПЛУ составляло 2:1. Образцы были получены в виде эластичных пленок черного цвета с содержанием графена 1–5% (масс.). Проведенные испытания показали, что добавление графена к полимеру приводит к увеличению электропроводности, достигающей значения 4×10^{-1} См/см.

Таким образом, был разработан метод получения графеновых дисперсий с концентрацией графена до 1,5 мг/мл. Получены однородные пленочные материалы на основе хитозана и графена, которые обладают хорошей электропроводимостью, улучшенными механическими характеристиками, а также не являются токсичными.

РОЛЬ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

Людмила Борисовна Буравкова

Лаборатория клеточной физиологии, ФГБУН ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

buravkova@imbp.ru

Внеклеточное микроокружение (биохимические и биофизические факторы) является одним из главных регуляторов регенеративных и репаративных процессов. Механизмы действия отдельных факторов и их комплексное влияние еще предстоит проанализировать. Интенсивное исследование прогениторных клеток *in vitro* приводит к накоплению данных о влиянии физических факторов на функциональное состояние и дифференцировку МСК. Важная роль в этих процессах принадлежит цитоскелету и молекулам адгезии. Особенно важным эти вопросы становятся при использовании носителей различной природы для создания биоинженерных конструкций, когда от жесткости/пластичности и адгезивных свойств материала зависит адгезия и коммитирование клеток. Показано, что МСК наряду с рядом других тканеспецифичных клеток обладают механочувствительностью. Важную роль в этих процессах играет внеклеточный матрикс, который через реорганизацию цитоскелета регулирует взаимодействие клеток с микроокружением, жизнеспособность и дифференцировку. Для возможного управления функциональным состоянием МСК необходимо изучать пересечение внутриклеточных путей проведения механического сигнала и регуляторные связи от факторов роста и интерлейкинов (от биохимических регуляторов). Снижение интенсивности влияния механического фактора хорошо иллюстрируется в условиях невесомости. Продемонстрированные в экспериментах изменения цитоскелета, молекул адгезии и коммитирования позволяют с уверенностью говорить о гравичувствительности МСК, а выявленные изменения скелета, мышц и др. требуют внимательного анализа. С другой стороны, невесомости и моделирование микрогравитации в наземных условиях уже используют для получения органоидов, поскольку эти условия позволяют исключить

седиментацию, приводящую к контакту с поверхностью и началу дифференцировки. Еще одной областью механобиологии является изучение гидростатического давления на хондрогенез. Этот подход используется для создания хрящевых ткане-инженерных конструкций. Таким образом, биофизические сигналы и факторы могут i) генерировать, усиливать или поддерживать биохимические сигналы для спецификации мезенхимальных предшественников и для тонкой настройки процессов дифференцировки и ii) играть решающую роль в формировании тканевых структур с соответствующими биологическими функциями.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04026.

EX VIVO ЭКСПАНСИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ПУПОВИННОЙ КРОВИ: РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ И НЕКЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Людмила Борисовна Буравкова, Ирина Вячеславовна Андрианов, Екатерина Андреевна Голикова, Александра Николаевна Горгостаева

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Россия

buravkova@imbp.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) из жировой ткани являются хорошей альтернативой МСК из костного мозга, поскольку эффективно поддерживают экспансию ex vivo гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСК). Мононуклеары пуповинной крови содержат ГСК, однако их небольшое количество является серьезным ограничением для использования в клеточной терапии. Экспансия ГСК ex vivo позволяет амплифицировать гемопоэтические предшественники различной степени коммитирования.

МСК из жировой ткани эффективно поддерживают ГСПК из пуповинной крови. По сравнению с 20% O₂, при «физиологической» гипоксии (5% O₂) обнаружено достоверно больше гемопоэтических КОЕ среди флолирующих ГСПК, а также КООБ среди МСК-ассоциированных ГСК. По крайней мере, часть этих эффектов может быть обусловлена изменением функциональной активности МСК, в которых при «физиологической» гипоксии более активно экспрессируются гены, отвечающие за адгезию клеток, продукцию и ремоделирование внеклеточного матрикса. МСК-ассоциированные ГСК включают субпопуляцию CD45⁺/CD90⁺ некоммитированных гемопоэтических предшественников, что делает их востребованным продуктом в клеточной терапии и регенеративной медицине. В МСК, ассоциированных с ГСК, повышена экспрессия генов, отвечающих за иммуносупрессивную активность (IDO, LIF, PTGS2). МСК в составе ассоциатов с ГСК эффективно ингибируют активацию и пролиферацию аллогенных стимулированных Т-лимфоцитов. Транскрипция и секреция VEGF также увеличена, указывая на возможную стимуляцию роста сосудов.

Таким образом, сочетание факторов, характерных для тканевой ниши ГСК — стромального слоя и тканевого содержания O₂ обеспечивает выраженные стромальные эффекты с преимущественным поддержанием некоммитированных ГСК, обеспечивающих длительное поддержание кроветворения in vivo (LTC-IC). При этом МСК сохраняют свой собственный регенеративный потенциал, демонстрируя свойства «третьей ткани». Результаты исследования могут быть востребованы для создания

эффективных и контролируемых методических подходов, обеспечивающих получение большого количества гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток для трансплантации. Полученные результаты расширяют возможности использования МСК для нужд регенеративной медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-29-04026 и проекта в рамках Программы Президиума РАН № 18.

НОВАЯ ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК HELIS — ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР НОРМАЛЬНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Ольга Юрьевна Буренина¹, Наталия Леонидовна Лазаревич^{2,3}, Тимофей Сергеевич Зацепин^{1,4,5}, Мария Петровна Рубцова^{1,4,5}, Ольга Анатольевна Донцова^{1,4,5}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия;

² НИИ канцерогенеза ФГБНУ «Российский научный онкологический центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

³ Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия;

⁵ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

alunit@inbox.ru

Как известно, большая часть генома человека не кодирует белки, однако транскрибируется с получением РНК разного размера, в частности длинных некодирующих РНК (днРНК, >200 нуклеотидных остатков). Несмотря на относительно малую изученность этого класса молекул, существует ряд экспериментальных свидетельств об их участии практически во всех клеточных процессах, в том числе в дифференцировке, пролиферации и канцерогенезе. Наш проект направлен на поиск новых днРНК человека, экспрессия которых существенно меняется в различных типах рака печени по сравнению с условной нормой. Такие РНК могут иметь значительный потенциал в качестве диагностических или прогностических маркеров, а также могут быть использованы в качестве мишеней для терапии онкологических заболеваний.

HELIS (от англ. «healthy liver-specific») — новая днРНК, впервые охарактеризованная в нашей научной группе. В отличие от большинства известных днРНК, уровень ее экспрессии значительно падает при развитии злокачественных опухолей печени, в частности при гепатоклеточной карциноме. В образцах холангиокарциномы количество HELIS было практически невозможно детектировать с помощью кОТ-ПЦР, что согласуется с данными о ее специфичности именно для гепатоцитов. При этом при развитии доброкачественных опухолей печени, экспрессия днРНК снижалась незначительно. Эти факты позволяют рассматривать HELIS как потенциальный биомаркер. Интересно, что эта днРНК полностью отсутствует в «стандартных» клеточных линиях печени человека Huh7 и HepG2 (вероятно, ввиду их раковой природы), а направленная суперэкспрессия HELIS в Huh7 приводит к снижению скорости миграции клеток. Нами было установлено, что синтез HELIS значительно меняется в процессе дифференциации предшественников гепатоцитов — клеток HerraRG, используемых в научной практике в качестве аналога первичной культуры клеток печени.

В ходе культивирования НераRG образуют смешанную популяцию биллиарных клеток и гепатоцитов. Отсутствие HELIS в исходной культуре НераRG и ее аккумуляция при дифференцировке клеток позволяет предположить ее непосредственное участие в этом процессе и вероятное значение для регенерации печени.

Финансирование исследования: работа поддержана грантом РФФИ № 18-74-00120.

ОСОБЕННОСТИ УЧАСТИЯ КМБ-2 В РЕГУЛЯЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО ОСТЕОПОРОЗА

Александра Юрьевна Бурматова

Кафедра биохимии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

alex.burmatova@mail.ru

Введение. Иммуобилизационный остеопороз (ИОП) — снижение минеральной плотности костной ткани вследствие длительной иммобилизации. Актуальность изучения механизмов регуляции посттравматической регенерации костной ткани в условиях ИОП обусловлена тем, что на фоне ИОП увеличивается длительность сроков сращения, исходы лечения часто оказываются неудовлетворительными (В.С. Оганов, 2009, С.В. Гюльязарова, 2014). Представляет интерес исследование костного морфогенетического белка 2 (КМБ-2), одного из основных регуляторов остеогенеза, в процессе репарации костной ткани в условиях ИОП.

Материал и методы. Путем ампутации кости голени правой задней конечности 10-ти крысам-самцам линии Вистар моделировали ИОП. На 90 сутки после ампутации (когда был сформирован ИОП) производили перелом большеберцовой кости левой задней конечности (малоберцовая кость при этом выступала в роли естественной шины). Группа сравнения — 10 здоровых крыс линии Вистар, которым также производили перелом большеберцовой кости. На 14 и 30 сутки после травмы животных выводили из эксперимента и в костных гомогенатах большеберцовых костей травмированной и интактной конечностей определяли концентрацию КМБ-2 в пересчете на грамм белка.

Результаты. На 14 сутки после перелома уровень КМБ-2 в травмированной конечности здоровых животных был значимо выше в 2,1 раза ($p \leq 0,01$), чем у животных с ИОП. При этом уровень КМБ-2 в травмированной конечности по сравнению с интактной в группе здоровых животных отличался в 3,7 раза, а в группе животных с ИОП в 1,45 раза ($p \leq 0,05$).

Уровень КМБ-2 на 30 сутки после перелома в травмированной конечности животных без ИОП был значимо выше в 2,36 раз, чем у животных с ИОП ($p \leq 0,01$). Концентрация КМБ-2 у здоровых животных была в 1,84 раза выше в травмированной конечности по сравнению с интактной ($p \leq 0,01$) (у животных с ИОП уровень КМБ-2 значимо не отличался).

Выводы. КМБ-2 на всех этапах репаративного остеогенеза является критически важным регулятором — стимулирует дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеогенном направлении, поддерживает активность остеобластов, контролирует минерализацию костного матрикса (R.N. Wang, 2014, J. Sun, 2015). Полученные данные свидетельствуют о значительном снижении участия КМБ-2 в процессе репаративного

остеогенеза у животных с ИОП по сравнению со здоровыми животными как на стадии репарации, так и на стадии ремоделирования костной ткани, что во многом объясняет наблюдаемые в клинической практике случаи несращения переломов.

ФУНКЦИИ БЕЛКА IGFBP3 В КУЛЬТУРЕ СТАРЕЮЩИХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА: СЕКРЕЦИЯ, ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ, ПАРАКРИННАЯ ИНДУКЦИЯ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК МИКРООКРУЖЕНИЯ

Елена Борисовна Бурова, Ирина Олеговна Васильева, Вера Владиславовна Кошеверова, Михаил Алексеевич Витте, Римма Сергеевна Каменцева, Алла Николаевна Шатрова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

lenbur87@mail.ru

Преждевременное старение стволовых клеток, индуцированное в стрессовых условиях, в том числе при действии окислительного стресса, сопровождается появлением секреторного фенотипа, связанного со старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Секретированные SASP факторы могут запустить прогерамирования в соседних нормальных клетках через паракринный механизм, способствуя распространению старения в популяции. В отношении стромальных стволовых клеток эндометрия человека (СКЭ), механизм регуляции секреции SASP факторов из старых клеток, а также их паракринная активность остаются недостаточно изученными. Ранее мы провели протеомный анализ секрета старых СКЭ и, применив методы биоинформатики, предположили роль одного из компонентов — белка IGFBP3 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3) в индукции старения молодых клеток. В настоящей работе показано, что уровень секреции растворимого фактора IGFBP3 увеличивается в процессе H_2O_2 -индуцированного старения СКЭ, зависит от исходной плотности культуры клеток, метода сбора кондиционированной среды (КС) и регулируется, в основном, активностью PI3K/Akt пути, в отличие от MAPK каскадов, вносящих минорный вклад. Для доказательства паракринного действия IGFBP3 применяли либо иммуноистощение КС по IGFBP3, либо добавление экзогенного белка. Среда старых клеток, истощённая специфическими антителами к IGFBP3, оказывала меньший эффект на старение молодых СКЭ, по сравнению с не модифицированной средой, и даже индуцировала их рост. Напротив, молодые клетки приобретали фенотип старения в ответ на пролонгированное действие экстраклеточного рекомбинантного IGFBP3, что было подтверждено увеличением доли SA- β -Gal позитивно окрашенных клеток и уменьшением экспрессии маркера CD146. Методом конфокальной микроскопии, используя маркеры ранних эндосом (EEA1) и поздних эндосом/лизосом (LAMP1), выявлена локализация экзогенного IGFBP3 в составе ранних эндосом, но не лизосом. Следовательно, интернализованный путём эндоцитоза IGFBP3 подвергается, скорее, рециклированию, чем деградации. Полученные результаты демонстрируют существенную роль IGFBP3 в паракринной индукции старения молодых клеток. Понимание молекулярных механизмов, регулирующих SASP-зависимое старение СКЭ, в перспективе должно способствовать более эффективному использованию этих клеток в качестве трансплантационного материала для регенерации повреждённых органов и тканей.

Поддержка: грант РФФИ № 19-04-00598.

РАЗЛИЧНЫЕ СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РАНЕВОГО ЗАЖИВЛЕНИЯ

Александра Валерьевна Бутенко¹, Анатолий Борисович Шехтер¹, Алексей Леонидович Файзуллин¹, Анатолий Федорович Ванин¹, Александр Валерьевич Пекшев², Татьяна Георгиевна Руденко¹

¹ Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;

² Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия

butsandra@yandex.ru

Оксид азота (NO) обладает бактерицидным и ранозаживляющим действием. Более 20 лет изучаются различные способы его доставки для стимуляции регенерации. В данном исследовании сравнивали эффективность применения NO-содержащего NO газообразного потока (NO-СГП) (аппарат «Плазон») и низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиольными лигандами для заживление ран.

Эксперимент проводился на 40 крысах (Wistar, 120–140 г). После циркулярного иссечения тканей диаметром 8–10 мм до собственной фасции в межлопаточной области животным устанавливалось тefлоновое кольцо, покрытое перфорированной полиэтиленовой пленкой. Были сформированы 2 группы, каждая из них включала 4 подгруппы по 5 животных. При исследовании эффективности газообразного NO (группа 1) животные подгруппы 1 лечения не получали (контроль). Животных других подгрупп обдували NO-СГП в течение 90 секунд на 1, 2, 3 дни после операции. Во 2 подгруппе температура NO-СГП (tNO-CGF) была 60°C, концентрация NO (NOc) – 560 ppm; в 3 – tNO-CGF – 22°C, NOc – 560 ppm; в 4 – tNO-CGF – 22°C, NOc – 1120. При исследовании ДНКЖ (группа 2) крысам путем микроинъекций в дно раны вводили: в 1 подгруппе – 0,5 мл 0,9% NaCl (контроль), во 2 – ДНКЖ с цистеином 5 ммоль, в 3 – ДНКЖ с глутатионом 2,5 ммоль (дважды, до общей концентрации 5 ммоль), в 4 – ДНКЖ с S-нитрозотиолом 5 ммоль (дважды, до общей концентрации 10 ммоль). На 4 день крыс выводили из эксперимента. Полученный материал анализировали гистологическими, иммуногистохимическими, морфометрическими и статистическими методами.

Наибольшую эффективность при заживление ран оказывали NO-СГП в дозе 1120 ppm и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами общей концентрацией 5 ммоль. В этих группах была статистически доказана более низкая интенсивность воспаления и высокий коэффициент регенерации, чем в контроле (p<0,001). При морфометрическом исследовании в данных группах выявлялся толстый слой грануляционной ткани и умеренно выраженный слой фибрина; в контроле фибриновый слой преобладал над грануляционным. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало выраженную реакцию с антителами к коллагену I и III типов в экспериментальных группах, которая достигала максимума в 4 подгруппе 1 группы, 1 и 2 подгруппах 2 группы. Высокая концентрация ДНКЖ (10 ммоль) не способствовала регенерации. Температура газового потока NO не влияла на процесс заживления.

Таким образом, NO, независимо от способа доставки к области повреждения, стимулирует раневое заживление.

ОСТЕОИНДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕН-ФИБРОНЕКТИНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С BMP-2 НА МОДЕЛИ ОРТО- И ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОГО НЕООСТЕОГЕНЕЗА У КРЫС

Татьяна Борисовна Бухарова¹, Андрей Вячеславович Васильев^{1,2}, Валерия Сергеевна Кузнецова², Егор Олегович Осидак³, Елена Валерьевна Галицына¹, Георгий Евгеньевич Леонов¹, Наталья Леонидовна Фатхудинова², Сергей Петрович Домогатский³, Игорь Иванович Бабиченко², Дмитрий Вадимович Гольдштейн¹, Анатолий Алексеевич Кулаков²

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Москва, Россия;

² ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ООО фирма «ИМТЕК», Москва, Россия

tilia7@ya.ru

Актуальность. Использование аутотрансплантатов костной ткани широко распространено в связи с их способностью индуцировать неоостеогенез. Забор костных аутотрансплантатов имеет недостатки, связанные с дополнительным хирургическим вмешательством для забора кости из донорского участка, сопровождающимся болевыми ощущениями, потерей крови, развитием гематом и риском инфицирования. В свою очередь проблемой существующих активированных факторами роста материалов, таких как Infuse Bone Graft, является использование супрофизиологических доз остеоиндукторов, что провоцирует гиперостоз и деформацию кости. Гидрогель на основе высокоочищенного коллагена – наиболее перспективный материал для решения поставленных задач, поскольку помимо способности к пролонгированному высвобождению BMP-2, биорезорбции и отсутствия антигенных свойств, способствует васкуляризации соединительной ткани и пролиферации её клеток. В процессе деградации коллагена образуются вещества, способные выводиться из организма или участвовать в синтезе новых белков при регенерации, в том числе в образовании собственного коллагена.

Цель. Оценить биосовместимость и способность индуцировать орто- и гетеротопический неоостеогенез коллаген-фибронектиновых гидрогелей, насыщенных rhBMP-2.

Материалы и методы. Стерильный 10% нейтральный раствор коллагена I типа свиньи смешивали с фибронектином человека в соотношении по объему 1:4. Для придания материалу остеоиндуктивных свойств в коллаген-фибронектиновую смесь добавляли rhBMP-2 до получения конечной концентрации 10 мкг/мл. Полученные смеси инкубировали при 4°C в течение 24 ч. Материалы исследовали при подкожной имплантации в области холки, внутримышечной в трёхглавой мышце бедра и внутрикостной при критическом дефекте теменных костей у 36 (по 12 в группе) крыс линии Wistar. Полученные на 28 сутки некропии зон имплантации исследовали гистологически и проводили морфометрию.

Результаты. При подкожной имплантации коллаген-фибронектинового гидрогеля, импрегнированного 10 мкг/мл rhBMP-2 (Acron), новообразованная костная ткань была выявлена по периферии материала вдоль растущих сосудов и составляла 8±4% относительно исходного объёма материала. При внутримышечной

и при внутрикостной имплантации костная ткань образовывалась преимущественно в центре материала, формируя первичные остеоны и наслоения молодой пластинчатой костной ткани, соответственно составляя $17\pm 10\%$ и $25\pm 11\%$ относительно исходного объема материала.

Работа выполнена за средства госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА CFTR НА МОДЕЛИ КИШЕЧНЫХ ОРГАНОИДОВ ПРИ НОВЫХ И РЕДКИХ МУТАЦИЯХ ГЕНА

Татьяна Борисовна Бухарова¹, Анна Сергеевна Ефремова¹, Наталья Владимовна Булатенко¹, Юлия Леонидовна Мельяновская¹, Ника Валентиновна Петрова¹, Наталия Юрьевна Каширская¹, Елена Кястугисовна Жекайте^{1,2}, Рена Абульфазовна Зинченко¹, Елена Ивановна Кондратьева^{1,2}, Дмитрий Вадимович Гольдштейн¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Москва, Россия;

² ГБУЗ МО «Московский областной консультативно-диагностический центр для детей», МО, Мытищи, Россия

bukharova-rmt@yandex.ru

Введение. Кишечные органоиды (КО) — это самоорганизующиеся структуры из однослойного эпителия по клеточному составу и выполняемым клетками функциям идентичные слизистой кишечника. Они являются 3-D тканеподобной *in vitro* моделью длительного культивирования, на которой проводят оценку функции белка CFTR для персонализированной диагностики муковисцидоза и изучения влияния таргетных препаратов. Известно более 2000 мутаций гена *CFTR*, большая часть из них редкие или даже уникальные. Форсколиновый тест на КО позволяет исследовать остаточную функцию белка CFTR при любых мутациях гена, в том числе редких или даже единичных, определить их патогенность. Степень набухания КО при стимуляции форсколином коррелирует с остаточной активностью канала CFTR. Кроме того, у органоидов с нарушенной функцией белка редуцирован размер внутренней полости (люмена).

Цель исследования. Оценить функциональную активность канала CFTR у больных муковисцидозом с редкими генетическими вариантами гена *CFTR* с.3274T>C, с.1083G>A и с.1735G>T.

Материалы и методы. Культуры КО получали по стандартным протоколам из ректальных биоптатов пациентов с редкими генетическими вариантами *CFTR* и пациента с распространенным генотипом с.[1521_1523delCTT];[с.1521_1523delCTT] в качестве контроля. Для оценки остаточной функции канала CFTR КО окрашивали Calcein AM и обрабатывали 5 мкМ форсколина в течение 1,5 ч. Использовали таргетные препараты VX-809 (корректор) и VX-770 (потенциатор). Изображения получали с помощью микроскопа Observer.D1 (Zeiss).

Результаты. Органоиды, полученные у пациентов с генетическими вариантами с.1083G>A и с.1735G>T, в ответ на действие форсколина не изменяли морфологию — набухания или увеличения люмена не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии функционального канала CFTR. Для КО с мутацией с.1083G>A было показано умеренное набухание при совместном

воздействии VX-809 и форсколина ($38\pm 5,2\%$), что свидетельствует о частичном восстановлении активности CFTR корректором. Органоиды, полученные у пациента с мутацией с.3274T>C, имели сферическую форму, большой размер люмена, тонкие стенки и характеризовались высокой функциональной активностью CFTR. При этом VX-770 усиливал действие форсколина, а VX-809 не влиял на набухание.

Результаты форсколинового теста показывают, что мутации с.1083G>A и с.1735G>T являются «тяжелыми» патогенными и приводят к утрате функции канала CFTR, а мутация с.3274T>C не является клинически-значимой.

Исследование выполнено за счет средств Госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КАРДИОСФЕР

Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова
ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

eleagnusom@gmail.com

Разработка новых подходов к восстановлению поврежденного миокарда является одной из важнейших задач современной кардиологии. Однако разработка средств таргетного воздействия требует наличия моделей, которые с определенной долей допущения соответствуют специфическому клеточному микроокружению — «клеточным нишам» (КН), содержащим прогениторные и поддерживающие клетки, компоненты матрикса, сгруппированные в 3D условиях. Подобной 3D моделью КН сердца могут служить кардиосферы (КС).

Цель: разработать метод получения и выполнить характеристику клеточного состава КС.

В работе использованы образцы миокарда мышей C57Bl6. Для получения эксплантной культуры использовалась среда IMDM, содержащая 20% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), глутамин, 2-меркаптоэтанол (МЭ), антибиотики; для сборки КС — комбинированная среда 35% IMDM/65% DMEM-F12, содержащая 3% ФСТ, глутамин, МЭ, EGF, bFGF, кардиотрофин-1, тромбин, B27 и антибиотики. Исследование иммунофенотипа проводили с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания. Пролиферацию оценивали МТТ тестом, васкулогенные свойства — Tube assay.

Показано, что культивирование образцов миокарда в виде эксплантной культуры с последующим сбором кардиосферообразующих клеток и их культивированием в соответствующих условиях способствует сборке КС. КС представляют собой 3D сфероиды с высоким уровнем компактизации, состоящие из клеток и белков внеклеточного матрикса. В центральной части КС локализуются клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток Oct4 и c-kit, которые окружены клетками мезенхимального фенотипа (CD105⁺, CD73⁺) и сосудистыми/кардиальными клетками-предшественницами (Gata4⁺, Pecam⁺, SMA⁺). Пересадка сформированных КС в среду с высоким содержанием сыворотки способствует «разборке» КС и получению 2D гетерогенной культуры клеток. Эти клетки обладают клоногенностью и способностью к тубулогенезу при культивировании на чашках, покрытых Matrigel™. Тубулярные структуры окрашиваются на маркеры эндотелия, что свидетельствует об ангиогенном

потенциале клеток КС. Культивирование клеток КС на чашках, покрытых коллагеном 1 типа или фибронектином, усиливает их пролиферативную активность. Возвращение клеток в среду для КС способствует повторной сборке 3D КС.

Таким образом, нами разработан метод получения КС, которые имеют сходное строение с КН сердца, и могут быть использованы в качестве 3D модели для изучения их регуляции и тестирования фармакологических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00430.

ПОВЫШЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ТЕРМОТРОПНЫХ ХИТОЗАНОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Андрей Вячеславович Васильев^{1,2}, Валерия Сергеевна Кузнецова¹, Татьяна Борисовна Бухарова², Юрий Дмитриевич Загоскин³, Елена Валерьевна Галицына², Тимофей Евгеньевич Григорьев³, Сергей Николаевич Чвалун³, Дмитрий Вадимович Гольдштейн², Анатолий Алексеевич Кулаков¹

¹ ФГБУ «ЦНИИ Стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

vav-stom@yandex.ru

Актуальность. При использовании термотропных композиций на основе хитозановых гидрогелей и β -глицерофосфата в качестве основы для костно-пластического материала мы сталкивались с их низкой биосовместимостью, критическая оценка которой в литературе представлена скудно и не имеет систематических подходов к решению.

Цель исследования: повысить биосовместимость хитозановых гидрогелей за счёт: (1) повышения степени деацетилирования и уменьшения количества свободных аминогрупп; (2) диализа и отмывки буферными системами от остатков β -глицерофосфата и уксусной кислоты; (3) включения в состав гелей высокопористых полилактидных (PLA) гранул.

Материалы и методы. Для получения гидрогелей хитозан растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли 95% водный раствор β -глицерофосфата при 4°C. Для уменьшения степени деацетилирования (DD%) исходный хитозан реацетилировали с 65 до 20 DD%. Для удаления остатков реагентов проводили диализ против воды в течение 3 сут. или добавляли 0,1 М раствора NaOH и 0,1 М буфера NaHCO₃. Высокопористые PLA-гранулы были получены распылением замороженных эмульсий с применением сублимационной сушки и смешивались с гидрогелем в концентрации 4%, 8%, 16% по массе. Материалы исследовали на модели подкожной имплантации у крыс Wistar. Забор некропсий осуществляли на 14 сут. При гистологическом исследовании таксис лейкоцитов оценивали в баллах от 0 до 5 (1 — единичные лейкоциты; 2 — незначительное скопление лейкоцитов; 3 — множество лейкоцитов по периферии материала; 4 — лейкоцитарный детрит внутри материала; 5 — перифокальная инфильтрация).

Результаты. Исходный уровень лейкоцитарной инфильтрации при имплантации хитозановых гидрогелей

в среднем составлял 4,5 балла. Снижение степени деацетилирования до 35% приводило к статистически значимому снижению лейкоцитарной инфильтрации до 2 баллов. При 20 DD% число лейкоцитов снижалось и соответствовало 1 баллу. Диализ гидрогелей хитозанов снижал лейкоцитарную инфильтрацию до 3 баллов, а при добавлении β -глицерофосфата с последующим диализом до 1 балла. Применение раствора щёлочи NaOH и буфера NaHCO₃ напротив усиливало воспалительный ответ. Наиболее выраженное снижение уровня лейкоцитарной инфильтрации (до 2 баллов) наблюдалось при насыщении гидрогелей PLA-гранулами до 16%, что предположительно связано с уменьшением объёма гидрогеля и увеличением площади его взаимодействия с белками плазмы крови, снижающими положительный заряд хитозана.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФ № 16-15-00298-П.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА НА МОДЕЛИ ЭКСТРАКЦИОННОЙ ЛУНКИ КАРЛИКОВЫХ СВИНЕЙ

Андрей Вячеславович Васильев^{1,2}, Валерия Сергеевна Кузнецова¹, Татьяна Борисовна Бухарова², Юрий Дмитриевич Загоскин³, Тимофей Евгеньевич Григорьев³, Егор Олегович Осидак⁴, Сергей Петрович Домогатский⁴, Игорь Иванович Бабиченко¹, Андрей Геннадьевич Надточий¹, Сергей Николаевич Чвалун³, Дмитрий Вадимович Гольдштейн², Анатолий Алексеевич Кулаков¹

¹ ФГБУ «ЦНИИ Стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

⁴ ООО фирмы «ИМТЕК», Москва, Россия

vav-stom@yandex.ru

Актуальность. Популярность применения природных полимеров в качестве основы для активированных костно-пластических материалов обусловлена их высокой биологической совместимостью. Однако для придания материалам остеоиндуктивных свойств требуется введение в состав факторов роста с контролируемым периодом высвобождения. Ранее нами была показана способность пролонгированного высвобождения BMP-2 из композиционных материалов на основе хитозанового гидрогеля, наполненного высокопористыми полилактидными гранулами, и коллагенового гидрогеля. Данные композиции отверждаются при 37°C и сохраняют заданную форму, что позволяет использовать их без армирующих конструкций. Определение эффективности применения разработанных материалов требует исследований *in vivo* на моделях крупных лабораторных животных в условиях, приближенных к реальным клиническим ситуациям.

Цель. Оценить биосовместимость и способность композиционных материалов на основе хитозанового и коллагенового гидрогелей, импрегнированных rhBMP-2, индуцировать неостеогенез на модели экстракционной лунки карликовых свиней.

Материалы и методы. Для изготовления хитозанового гидрогеля хитозан растворяли в уксусной кислоте и диализовали. К полученному раствору при 4°C добавляли водный раствор β -глицерофосфата и затем насыщали высокопористыми полилактидными гранулами с rhBMP-2, приготовленными методом лиофилизации. Коллагеновый гидрогель получали путем смешивания 10% нейтрального раствора коллагена I типа свиньи с rhBMP-2 и человеческим фибронектином в соотношении 1: 4. Концентрация rhBMP-2 в материалах составляла 10 мкг/мл. В исследовании участвовали 6 взрослых самцов карликовых свиней, которым удаляли резцы верхней и нижней челюстей с последующим заполнением лунок исследуемыми материалами. Животных выводили из эксперимента через 28 суток. Полученные фрагменты челюстей исследовали с помощью рентгенологических, гистологических и морфометрических методов с целью анализа способности материалов индуцировать первичный неоостеогенез.

Результаты. Имплантированные материалы на основе коллагена и хитозана не вызывали воспалительной реакции. При использовании гидрогеля на основе хитозана и высокопористых полилактидных частиц, по данным КТ и гистологического исследования, отмечалось образование $38 \pm 24\%$ костной ткани. Материал на основе коллаген-фибронектинового геля индуцировал образование $53 \pm 35\%$ новой кости от общего объема лунки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-00298-П.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПОСТНАТАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ И(ИЛИ) ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК-ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ИЗ ВОЛОСЯНОГО Фолликула И ДЕРМЫ КОЖИ

Роман Геннадьевич Васильев¹, Анжела Евгеньевна Родниченко¹, Ольга Сергеевна Губарь², Алена Васильевна Злацкая¹, Инна Михайловна Гордиенко³, Наталья Михайловна Тодосенко⁴, Светлана Николаевна Новикова¹, Лариса Сергеевна Литвинова⁴, Дмитрий Александрович Зубов¹

¹ Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

³ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

⁴ Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

romanvasyliev8@gmail.com

Постнатальные мультипотентные стволовые/прогениторные клетки-производные нервного гребня (мСКНГ) имеют значительный потенциал для использования в регенеративной медицине. Одними из самых перспективных источников для изоляции постнатальных мСКНГ являются волосяной фолликул (ВФ) и дерма кожи (ДК) вследствие легкой доступности и малой инвазивности процедуры забора биоптата.

Целью работы было провести изоляцию, крупномасштабную экспансию и составить сравнительную характеристику постнатальных мСКНГ из ВФ и ДК, полученных от тех же доноров.

мСКНГ из ВФ были получены методом эксплантов. Для изоляции мСКНГ из дермы кожи была разработана оригинальная технология, основанная на комбинации ферментативной диссоциации, прелейтинга и культивирования в селективных ростовых условиях. Полученные культуры мСКНГ были охарактеризованы с использованием методов проточной цитометрии, кариотипирования, иммуноцитохимии, ПЦР в реальном времени и мультиплексного анализа продукции факторов роста и цитокинов. Также были определены: частота КОЕ, способность к самообновлению путем субклонирования клональных колоний, способность к сферогенезу и направленной мультилинейной дифференцировке.

Постнатальные мСКНГ из ВФ и ДК были успешно получены во всех случаях от всех доноров ($n = 10$). Для получения клеток использовали 2 биоптата кожи $\varnothing 4$ от каждого донора. В культуре *in vitro* мСКНГ из ВФ и ДК имели различную морфологию (удлиненная веретеновидная vs компактной полигональной), при этом обладали сходным иммунофенотипом — $SO \times 10^+ CD271^+ NESTIN^+ SOX2^+ CD73^+ CD90^+ CD105^+ CD140a^+ CD140b^+ CD349^+ CD34^- CD45^- CD56^- CD117^- HLA-DR^-$. мСКНГ из дермы кожи показывали более высокую частоту КОЕ ($34 \pm 3\%$ vs $25 \pm 5\%$ у мСКНГ ВФ), большую скорость пролиферации в 2D условиях (PDT $30,2 \pm 3,8$ vs $34,4 \pm 8,0$ ч) и при культивировании в 3D фибриновом геле (PDT $30,2 \pm 3,8$ vs $34,4 \pm 8,0$ ч). Необходимо отметить, что после крупномасштабной экспансии (до терапевтической дозы более 100 млн клеток) результирующая популяция мСКНГ из дермы кожи содержала большее относительное количество клеток, позитивных по $SO \times 10$, $CD271$, $CD105$, $CD140a$, $CD146$ и $CD349$ ($p < 0,05$). мСКНГ из обоих источников экспрессировали на схожем уровне следующие гены: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*, *NANOG*, *SOX10*, *TFAP2A*, *LNGFR*, *NESTIN*, *SNAIL1*, *SNAIL2*, *TWIST1*, *VEGFA*, *FGF2*, *NGF*, *BDNF*, *GDNF*, *NTF3*, и *NTF4/5*. Необходимо отметить, что мСКНГ экспрессировали гены, характерные для плюрипотентных клеток (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC* и *NANOG*) на значительно более низком уровне, чем ЭСК и иПСК человека. мСКНГ ВФ показывали значительно более высокий уровень экспрессии *SOX9* по сравнению с мСКНГ из дермы кожи ($p < 0,05$). Также мСКНГ ВФ продуцировали большее количество следующих факторов роста, цитокинов и хемокинов: IL-6, IL-8, IL-16, sIL-2Ra, MCP-1, M-CSF и HGF ($p < 0,05$). В тоже время мСКНГ ДК показывали более высокую продукцию IL-3, CTACK, SDF-1a, GM-CSF, SCGF, VEGF-A, FGF-2 и NGF ($p < 0,05$). мСКНГ из обоих источников показывали схожую способность к направленной мультилинейной дифференцировке в нейроны, швановские клетки, меланоциты, адипоциты, остеобласты и хондроциты.

Таким образом, ВФ и ДК являются пригодными тканевыми источниками для изоляции и последующей крупномасштабной экспансии постнатальных мСКНГ со схожими морфофункциональными свойствами. Однако необходимо отметить, что мСКНГ из дермы кожи демонстрируют более высокую скорость пролиферации при культивировании как в 2D, так и в 3D условиях, имеют более высокий клоногенный потенциал и формируют более гомогенную популяцию после крупномасштабной экспансии.

БЕЗОПАСНОСТЬ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОФИЛИНГА И ЛОКАЛЬНЫХ ИНЪЕКЦИЙ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Вячеслав Сергеевич Васильев¹, Сергей Александрович Васильев¹, Жанна Ивановна Терюшкова², Юрий Сергеевич Васильев¹, Игорь Сергеевич Васильев¹, Илья Игоревич Еремин³

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия;

² МАУЗ «Городская клиническая больница № 8», Челябинск, Россия;

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

b_b_c@mail.ru

Введение. Инъекционная аутоперитрансплантация жировой ткани используется в хирургической практике уже более 100 лет. В течение двух последних десятилетий липофилинг стал применяться в хирургической практике значительно чаще. Также существенно расширился спектр показаний для инъекционной трансплантации жировой ткани, которая после работы P. Zuk et al. в 2001 году стала рассматриваться как богатый источник мультипотентных мезехимальных стволовых клеток (ММСК). Помимо собственно жирового трансплантата в практике стали применяться и продукты на его основе различные по качественному и количественному составу, в частности стромально-васкулярная клеточная фракция (СВКФ), содержащая ММСК и субпопуляции прогениторных клеток. Учитывая подтвержденную клиническую эффективность использования продуктов на основе липоасpirата для лечения рубцовых изменений, хронических ран, поздних лучевых повреждений, неудивительно, что одной из сфер их применения стала онкология. Вместе с тем, актуальным является вопрос онкологической безопасности инъекций жировой ткани и СВКФ.

Методы. С целью определения потенциального риска применения липофилинга и локальных инъекций СВКФ у онкологических пациентов, нами произведен анализ литературных данных и собственного клинического материала. Проанализировано 53 источника литературы, посвященных данной проблеме. Собственный опыт включил 241 случая, из которых 121 — липофилинг с целью реконструкции молочной железы, 63 — липофилинг в сочещении с СВКФ для лечения поздних лучевых повреждений прямой кишки, 33 — липофилинг для лечения хронических постлучевых лучевых ран, 21 — липофилинг с целью устранения контурных дефектов области головы и шеи.

Результаты. При анализе литературных данных удельный вес местных и системных рецидивов после липофилинга у пациентов, перенесших противоопухолевое лечение, составил 2,5% и 2,0% соответственно. При использовании СВКФ рецидивов отмечено не было. При анализе собственных данных удельный вес местных и системных рецидивов составил 0,4% и 1,7% соответственно. У пациентов с постлучевыми повреждениями прямой кишки, которым применялся липофилинг в сочетании с СВКФ, прогрессирования онкологического заболевания отмечено не было.

Выводы. Таким образом, применение липофилинга и локальных инъекций стромально-васкулярной клеточной фракции не связано с повышенным риском локальных и системных рецидивов у онкологических пациентов.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНОГО ЛИПОАСПИРАТА В КОРРЕКЦИИ РУБЦОВ

Вячеслав Сергеевич Васильев¹, Сергей Александрович Васильев¹, Жанна Ивановна Терюшкова², Юрий Сергеевич Васильев¹, Игорь Сергеевич Васильев¹, Илья Игоревич Еремин³

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия;

² МАУЗ «Городская клиническая больница № 8», Челябинск, Россия;

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

b_b_c@mail.ru

Введение. В медицинской практике существует большое множество способов коррекции рубцов: начиная от косметологических методов (пилинг, лазерная шлифовка, и т. д.) и заканчивая хирургической коррекцией рубца. Инъекционная трансплантация продуктов на основе аутологичного липоасpirата (милли-, микро-, нанотрансплантат) является малоинвазивным хирургическим методом, значительно расширяющим возможности коррекции рубцовых повреждений. С одной стороны, данный метод позволяет выполнить механическое ремоделирование рубцовой ткани, не прибегая к разрезам, с другой — введенный жировой трансплантат дополнительно оказывает биологический эффект, выражающийся в антифибротическом и проангиогенном действии.

Методы. Методика была применена 245 пациентам с различными типами рубцовых повреждений. Большую часть составили приобретенные дефекты (послеоперационные, посттравматические и послеожоговые рубцы — 157 случаев; рубцовые повреждения, сочетанные с наличием поздних лучевых повреждений — 54 случая; контрактура Дюпюитрена — 14 пациентов). Из врожденных патологий методика была использована для коррекции тубулярной деформации молочной железы в 16 случаях, реконструкции груди при синдроме Поланда — 4 случая.

Забор жировой ткани осуществлялся посредством вакуумной липосакции канюлями диаметром 2,5 мм. В зависимости от клинической ситуации липоасpirат обрабатывался тремя способами: отстаивание в течение 15 мин., центрифугирование при 1200 g в течение трех мин. и эмульгация. Введение осуществлялось канюлями и острыми иглами в зависимости от типа и глубины рубца. При необходимости выполнялось чрескожное ремоделирование рубца. Для оценки результатов применялись клинические методы исследования, опросники, фотографирование, инструментальные методы.

Результаты. Во всех случаях были достигнуты положительные эстетические и функциональные результаты. 32% пациентов оценили результат как отличный, 41% — хороший, 24% — удовлетворительный, 3% как неудовлетворительный. В отдаленном послеоперационном периоде не наблюдалось рецидива рубца или патологического рубцевания. Напротив, в большинстве случаев в течение года после процедуру отмечалось нарастание положительного эффекта. Количество повторных этапов зависело от типа и размеров рубцового дефекта и составило от 1 до 3 процедур. Среди осложнений отмечено формирование липогранулём в 3% случаев.

Выводы. Инъекционная аутоперитрансплантация жировой ткани и продуктов на ее основе является безопасным и эффективным способом лечения рубцов.

МЕХАНИЗМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНОГО ЛИПОАСПИРАТА И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Вячеслав Сергеевич Васильев¹, Сергей Александрович Васильев¹, Жанна Ивановна Терюшкова², Юрий Сергеевич Васильев¹, Игорь Сергеевич Васильев¹, Илья Игоревич Еремин³, Евгений Алексеевич Ломакин¹, Георгий Павлович Димов¹

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия;

² МАУЗ «Городская клиническая больница № 8», Челябинск, Россия;

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

b_b_c@mail.ru

Введение. Механизмы приживления и биологические эффекты, оказываемые при инъекционном введении жирового трансплантата, изучены достаточно хорошо. Тем не менее, вопросы, касающиеся клинического применения различных продуктов на основе липоасpirата, требуют более подробного исследования. Основываясь на собственных данных, мы предлагаем дифференцированный подход к клиническому использованию милли-, микро-, нанотрансплантата и стромально-васкулярной фракции.

Методы. В зависимости от типа аспирационной канюли материал подразделялся на микро- (канюля с диаметром отверстий 1,5 мм) и миллитрансплантат (диаметр отверстий 2 мм и более). Для получения нанотрансплантата применялась эмульсификация микротрансплантата путем его 50-кратного прохода через зауженный переходник. С целью получения стромально-васкулярной фракции (СВФ) использовалась ферментативная обработка микротрансплантата коллагеназой II типа. Полученные из липоасpirата продукты оценивались путем фотографирования, цитологического и гистологического исследования. Для нанотрансплантата и СВФ также оценивались клеточность и жизнеспособность. Определение качественного состава путем проточной цитометрии выполнялось только для СВФ. В среднем показатель клеточности с 1 мл липоасpirата составил 500 000, при жизнеспособности 85–95%.

Результаты. Основными критериями различия между продуктами явились соотношение количества адипоцитов к другим клеткам липоасpirата и сохранность тканевой структуры. Миллитрансплантат содержал максимальные по размеру фрагменты жировой ткани (более 1,0–3,0 мм) для которых были характерны максимальные показатели содержания живых адипоцитов и сохранности тканевой структуры. Микро- и нанотрансплантат содержали графты 0,5–1,0 мм и менее 0,5 мм соответственно, и характеризовались уменьшением соотношения целых адипоцитов к остальным клеткам и сохранности тканевой структуры. Стромально-васкулярная фракция представляла собой чистый клеточный продукт без адипоцитов и внеклеточного матрикса.

Выводы. Различные способы обработки липоасpirата позволяют получать различные по структуре, составу и биологическим свойствам продукты. Алгоритм их клинического применения основан на преобладании того или иного типа клеток, сохранности тканевой структуры и физических свойствах.

БЕЗОПАСНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНЪЕКЦИОННОЙ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ПОСТЛУЧЕВЫХ РЕКТОВАГИНАЛЬНЫХ СВИЩЕЙ И ЯЗВ ПРЯМОЙ КИШКИ

Вячеслав Сергеевич Васильев¹, Жанна Ивановна Терюшкова², Андрей Владимирович Важенин³, Сергей Александрович Васильев¹, Евгений Алексеевич Ломакин¹, Георгий Павлович Димов¹, Илья Игоревич Еремин⁴

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия;

² МАУЗ «Городская клиническая больница № 8», Челябинск, Россия;

³ ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск, Россия;

⁴ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

danil-popov97@mail.ru

Введение. Постлучевые ректовагинальные язвы и свищи являются одной из самых сложных проблем колопроктологии. Существующие хирургические методы сопряжены с большим количеством осложнений, приводящим к рецидиву свища. В свою очередь консервативные методы обладают лишь временным симптоматическим эффектом, не приводя к излечению пациента. Целью данного исследования явилась оценка безопасности и эффективности нового метода лечения постлучевых ректовагинальных свищей — инъекционной аутоотрансплантации жировой ткани и стромально-васкулярной фракции.

Методы. С 2012 года лечение было проведено 39 пациенткам (34 пациентки — постлучевые ректовагинальные свищами, 5 — постлучевые язвы прямой кишки). Забор жировой ткани в объеме 100 мл осуществлялся посредством шприцевой липосакции канюлями диаметром 2,5 мм. Для подготовки к введению 50 мл жирового трансплантата подвергалось центрифугированию (1200 g в течение 3 мин.). Оставшиеся 50 мл липоасpirата подвергалось ферментативной обработке в коллагеназе 2 типа. Стромально-васкулярная фракция вводилась в слизистый и подслизистый слои ректовагинальной перегородки острой иглой 27G папульно диффузно. Жировой трансплантат вводился в глубокие слои ректовагинальной перегородки в объеме 10–20 мл через отдельные проколы на коже и в краниальной полуокружности свища канюлей диаметром 1 мм. Для оценки результатов применялись клинические методы исследования, опросники, фотографирование, инструментальные методы (колоноскопия, эластосонография, МРТ), гистологическое исследование.

Результаты. Во всех случаях наблюдалось полное закрытие постлучевых ректовагинальных свищей и язв прямой кишки в сроки от 3 до 9 месяцев. В зависимости от размеров дефекта, пациентам выполнялось от 1 до 4 этапов лечения с минимальным интервалом 3 месяца. Длительность заживления зависела от размеров дефекта. Непрерывность толстого кишечника восстанавливалась не ранее чем через 6 месяцев после закрытия свища. Ни в одном случае не наблюдалось развития рецидива ректовагинального свища в отдаленном периоде (6–18 месяцев). Также отмечено полное заживление постлучевых язв прямой кишки, происходившее без отключения толстого кишечника.

В ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде осложнений не наблюдалось.

Выводы. Инъекционная аутотрансплантация жировой ткани и стромально-васкулярной фракции является безопасным и эффективным способом лечения постлучевых ректовагинальных свищей и язв прямой кишки.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К БИОПЕЧАТИ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Игорь Викторович Вахрушев¹, Анастасия Валерьевна Цветкова², Юлия Борисовна Басок³, Алексей Михайлович Григорьев³, Людмила Анфилофьевна Кирсанова³, Елизавета Константиновна Нежурина⁴, Анна Александровна Грядунова¹, Елизавета Валерьевна Кудан¹, Павел Анатольевич Каралкин¹, Станислав Владиславович Петров¹, Владислав Александрович Парфенов¹, Алиса Александровна Крохмаль¹, Frederico Pegeira¹, Елена Анатольевна Буланова¹, Юсеф Джорджевич Хесуани¹, Владимир Александрович Миронов¹, Константин Никитич Ярыгин²

¹ Лаборатория биотехнологических исследований «ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

vakhrunya@gmail.com

Одним из распространенных способов трехмерного культивирования клеток является получение из них небольших сферических агрегатов, называемых сфероидами. В отличие от двумерных культур, в сфероидах клетки получают возможность образовывать контакты и обмениваться регуляторными сигналами, а также продуцировать экстрацеллюлярный матрикс. Сегодня сфероиды широко применяются в биопечати, где они используются в качестве исходных строительных элементов для построения тканеинженерных конструкций в соответствии с заданными пространственными моделями.

Настоящая работа посвящена разработке новых подходов к биопечати хряща с использованием МСК человека различного происхождения, а также созданию превазкуляризированных тканеинженерных конструкций на основе МСК и эндотелиоцитарных клеток.

Источниками культуры МСК послужили пульпа молочного зуба, Вартонов студень (строма) пуповины и подкожная жировая клетчатка. Анализ уровня экспрессии поверхностных маркеров показал, что МСК из всех источников обладали фенотипом, характерным для мультипотентных мезенхимальных клеток.

Сфероиды получали путем агрегации 8 тыс. клеток в низкоадгезивных 96-луночных планшетах. Хондрогенную дифференцировку проводили в течение 2 недель в среде, содержащей TGF- β 1. Гистохимический анализ всех образцов выявил програвисивное увеличение продуцируемого клетками

экстрацеллюлярного матрикса и присутствие в нем коллагена и гликозаминогликанов.

Далее были получены смешанные сфероиды на основе МСК пуповины и эндотелиоцитов пуповинной вены (8000 кл. в соотношении 1:1). Иммуногистохимический анализ, проведенный спустя две недели культивирования, показал наличие множества CD31⁺ клеток.

Пригодность получаемых сфероидов для биопечати была продемонстрирована в серии экспериментов с использованием различных биопринтеров оригинальной разработки.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что МСК из исследованных нами источников обладают выраженным хондрогенным потенциалом в условиях сфероидного культивирования, и, таким образом, служат доступной альтернативой первичным хондроцитам при разработке подходов к биофабрикации хрящевой ткани. Помимо этого было показано, что МСК обладают способностью образовывать смешанные сфероиды в сочетании с эндотелиоцитами, что решает актуальную проблему превазкуляризации тканеинженерных конструкций. Таким образом биопечать является новой областью применения МСК, глубоко раскрывающей их терапевтический потенциал.

ЭТИКО-ПРАВОВЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ МАНИПУЛЯЦИЙ С ЭМБРИОНАМИ И ПОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Елена Валерьевна Введенская^{1,2}

¹ Кафедра философии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

² Центр научно-информационных исследований по науке, образованию и технологиям, ИНИОН РАН, Москва, Россия

vvedenskaya.elena@gmail.com

В России с 1.01.2017 действует «Закон о биомедицинских клеточных продуктах», в ст. 3 которого говорится о недопустимости создания эмбриона человека в целях производства биомедицинских клеточных продуктов, а также о недопустимости использования для разработки, производства и применения биомедицинских клеточных продуктов биологического материала, полученного путем прерывания процесса развития эмбриона или плода человека или нарушения такого процесса. Закон следует конвенции Совета Европы о защите достоинства человека в связи с достижениями биологии и медицины (1997 г.), основным положением которой является то, что «интересы и благо отдельного человека преобладают над интересами общества или науки». В главе VI «Геном человека» говорится о том, что «вмешательство в геном человека, направленное на его модификацию, может быть осуществлено лишь в профилактических, диагностических или терапевтических целях и только при условии, что оно не направлено на изменение генома наследников данного человека».

К основным морально-этическим аргументам против генотерапевтического вмешательства в зародышевую линию относится право человека на сохранение и передачу потомкам неизменённого генома. Технологии генно-инженерных манипуляций с эмбрионами и половыми клетками человека представляют угрозу для человеческого достоинства и гуманного отношения к индивидам. Так, биологам давно известно, что человеческая жизнь

начинается со слияния сперматозоида с яйцеклеткой. Момент слияния сперматозоида и яйцеклетки приводит к формированию эмбриона, который ведет себя так же, как и целое существо. Из человеческой клетки появляется новый человек, которой должен стать зрелой индивидуальностью. Генетические эксперименты с эмбрионами до 14 дня развития и их последующее уничтожение подрывают всякие представления о ценности человеческой жизни.

Положение, сложившееся в области регенеративной медицины и клеточных технологий в РФ, характеризуется возникающими морально-этическими противоречиями между возможными последствиями применения новейших биотехнологий и традиционными представлениями о человеческом достоинстве и базовой установке врача — «не навреди». Нельзя игнорировать и факт заинтересованности некоторых исследователей, чьи научные интересы формируются под влиянием мощного финансирования, в быстром внедрении новейших медицинских биотехнологий в практику с целью извлечения выгоды, а не сохранения здоровья и жизни человека.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЭНДОТЕЛИЗАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Елена Анатольевна Великанова, Вера Геннадьевна Матвеева, Евгения Олеговна Кривкина, Виктория Владимировна Севостьянова, Татьяна Владимировна Глушкова, Марьям Юрисовна Ханова, Лариса Валерьевна Антонова

ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

antonova.la@mail.ru

Важным направлением тканевой инженерии является разработка протезов сосудов малого диаметра, на основе которых возможно воссоздание структуры нативного сосуда. Тромбообразование — основное осложнение, препятствующее внедрению тканеинженерных сосудов в клиническую практику, поэтому для предотвращения этого особенно важно создание эндотелиального слоя на внутренней поверхности графта. Целью работы было сравнение эффективности использования различных типов эндотелиальных клеток для заселения полимерного сосудистого графта в условиях пульсирующего биореактора.

Материалы и методы. Сосудистые графты изготавливали методом электроспиннинга из смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата), поли(ε-капролактона) и коллагена I типа. Внутреннюю поверхность графта покрывали раствором фибронектина. Структуру поверхности графтов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. На внутреннюю поверхность заселяли эндотелиальные клетки различного происхождения (эндотелиальные клетки коронарной артерии человека (HCAEC), эндотелиальные клетки почечной вены человека (HUVES), колониеформирующие эндотелиальные клетки, полученные из периферической крови пациентов с ИБС (ECFCs)). Графты культивировали в статических условиях, затем в пульсирующем биореакторе с максимальным значением напряжения сдвига 2,85 дин/см² (общее время культивирования — 7 суток). Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание

графта на CD31, VEGFR2, CD144, vWF, F-actin, ламинин, талин и на коллаген IV типа.

Результаты. При культивировании графтов в динамических условиях во всех случаях отмечали изменения, свидетельствующие об адаптации клеток к действию напряжения сдвига: ориентация вдоль потока, усиление экспрессии VEGFR2, увеличение секреции vWF, коллагена IV типа и ламинина, упорядочивание филаментов F-актина. Обращает внимание, что ECFCs при культивировании в статических условиях демонстрировали выраженную экспрессию CD34, которая затем снижалась под воздействием потока. На основании анализа плотности клеточного слоя после окончания динамического культивирования можно заключить, что ECFCs продемонстрировали наибольшую адгезию к полимеру и устойчивость к смыванию потоком, по сравнению с HCAEC и HUVES. С учетом возможности получения из легкодоступного источника (периферическая кровь), ECFCs можно признать перспективной культурой для заселения тканеинженерных сосудистых протезов.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗА-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДОНОРОВ

Константин Александрович Ветошкин, Наталья Васильевна Исаева, Мария Александровна Бутолина, Наталья Викторовна Минаева, Наталья Александровна Зорина, Марина Николаевна Хоробрых

ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров, Россия

kostyavetoshkin@yandex.ru

В настоящее время активно изучают иерархическую структуру мезенхимального компонента костного мозга. Установлено наличие стволовых мезенхимальных клеток-предшественниц с высоким пролиферативным потенциалом, обеспечивающих самоподдержание популяции. Тем не менее, не определены иммунологические маркеры стволовых элементов мезенхимальной природы. Известно, что в ранних клетках-предшественниках различных тканевых линий высока экспрессия фермента альдегиддегидрогеназы (ALDH). В то же время практически отсутствуют данные о количестве и динамике содержания ALDH-положительных (ALDH+) элементов в культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга доноров, и их возможной связи с показателями скорости роста культуры.

Цель работы — оценка значимости определения количества ALDH+ мезенхимальных стромальных клеток костного мозга доноров.

Выявлено значимое уменьшение относительного содержания ALDH+ мезенхимальных клеток с 59,2±18,0% (пассаж P1, n=10) до 28,2±10,7% (P3, n=10) и их абсолютного количества от 28,4±19,5×10⁶ (P1) до 7,5±3,8×10⁶ (P3; критерий Уилкоксона, p=0,024). Установлено снижение пролиферативной активности МСК в процессе культивирования по увеличению времени удвоения количества клеток от 59,9±18,5 ч (P1, n=10) до 106,6±19,2 ч (P3, n=10, критерий Уилкоксона p=0,02). Зарегистрировано достоверное увеличение

сроков достижения культурой МСК конфлюэнтного монослоя с $9,4 \pm 2,0$ сут. (P1) до $13,7 \pm 2,5$ сут. (P3, $n=10$, критерий Уилкоксона, $p=0,02$).

Известно, что показатели скорости роста культуры МСК зависят от количества клеток с высоким пролиферативным потенциалом. В этой связи проведен анализ зависимости между содержанием $ALDH^+$ клеток и временем достижения конфлюэнтного монослоя (коэффициент Пирсона $r=-0,66$), и между количеством $ALDH^+$ элементов, внесенных в культуру на P1 – P3, и временем удвоения клеток на данных пассажах ($r=-0,67$). Т.е., период удвоения клеточной популяции и время достижения 90–95% покрытия культуральной поверхности в значительной степени зависят от количества $ALDH^+$ МСК. С учетом определения стволовых клеток как элементов, обеспечивающих самоподдержание популяции, а также зависимости между показателями скорости роста культуры и количеством $ALDH^+$ клеток, можно заключить, что указанный маркер характеризует фракцию ранних мезенхимальных клеток-предшественниц (стволовые и мультипотентные клетки).

НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛУТАМАТНОЙ СИСТЕМЫ ГИППОКАМПА ПОТОМСТВА КРЫС, ВЫЗВАННЫЕ СТРЕССОРНЫМ ОТВЕТОМ МАТЕРИ НА ГИПОКСИЮ, ВОВЛЕКАЮТСЯ В ФОРМИРОВАНИЕ ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННОГО КОГНИТИВНОГО ДЕФИЦИТА

Олег Васильевич Ветровой^{1,2}, Виктор Андреевич Стратилон¹, Екатерина Иосифовна Тюлькова¹

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Кафедра биохимии, Биологический факультет, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

vov210292@yandex.ru

Настоящее исследование основано на идее о ключевой роли стрессорного ответа матери на внешние негативные воздействия в нарушении настройки порогов чувствительности сигнальных систем организма плода и, как следствие, формировании патологий постнатального развития. При этом профиль таких патологических процессов помимо наследственных факторов будет определяться текущим на момент воздействия этапом органогенеза и модальностью воздействия.

Настоящая работа с применением модели острой гипоксии *in vivo* (5% O_2 , 3 сеанса по 3 часа с интервалом в сутки), предъявляемой беременным самкам крыс линии Вистар на 14–16 сутки гестации, в период закладки гиппокампа, направлена на изучение особенностей функционирования глутаматэргической системы, основной медиаторной системы гиппокампа, на протяжении жизни потомства (2 недели, 3 месяца, 18 месяцев постнатального развития) и оценку их роли в формировании ассоциированных с возрастом нарушений пространственной памяти.

Показано прогрессирующее с возрастом уменьшение количества нейронов, увеличение плотности синапсов, количества метаболитных глутаматных рецепторов первого типа ($mGluR1$), рецепторов инозитол-3-фосфата первого типа, а также повышенный уровень выработки инозитол-3-фосфата в ответ на аппликацию агонистов $mGluR1$ в гиппокампе крыс, переживших

пренатальную гипоксию (ПГ), что указывает на устойчивую гиперактивацию внутриклеточного компонента $mGluR1$ -ассоциированного сигнального пути. Однако, в гиппокампе взрослых и стареющих крыс, переживших ПГ, наблюдается снижение количества глутамата, а при индукции глутаматной эксайтотоксичности, в отличие от контроля, не происходит увеличения генерации продуктов свободнорадикального окисления липидов, что указывает на тот факт, что повышенная активность рецепторного аппарата глутаматной системы животных, переживших ПГ, не уравнивает дефицит глутамата.

При этом в водном лабиринте Морриса для ПГ крыс показано прогрессирующее с возрастом нарушение пространственной памяти, нивелируемое инъекциями агонистов $mGluR1$, что подтверждает вовлечение глутаматной системы в формирование вызванного ПГ когнитивного дефицита.

По результатам проведенных исследований можно предположить, что в основе долгосрочных нарушений развития и функционирования гиппокампа вследствие пренатальной гипоксии лежит нарушение функционирования глутаматэргической медиаторной системы, вероятно вызванное ослаблением синтеза либо усилением деградации глутамата.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 17-04-01118.

ЛЕЧЕНИЕ ОСТЕОАРТРОЗА СОБАК МИКРОФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНЬЮ

Екатерина Владимировна Викторова, Ирина Петровна Савченкова, Светлана Александровна Васильева, Дарья Григорьевна Коровина

ФГБНУ «Федеральный Научный Центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» РАН, Москва, Россия

victorovaekaterina@gmail.com

На протяжении последних двадцати лет непрерывно возрастает научный интерес к клеточной терапии. В отечественной ветеринарии данное направление находится на зарождающемся этапе своего развития. В связи с этим, наша работа была направлена на изучение влияния микрофрагментированной аутологичной подкожной жировой ткани (ФАПЖТ), на процесс развития естественного остеоартроза (ОА) локтевого сустава собак. Таким образом, в условиях ветеринарной клиники было отобрано 12 собак, смешанного пола, пород: лабрадор ретривер; золотистый ретривер; боксер; шотландский сеттер; немецкая овчарка; метис; вес которых колебался в интервале 20–45 кг, возрастом от 1 года до 9 лет. Все животные были отобраны по наличию следующих показателей: стойкая хромота при прогулочной ходьбе и болевое ограничение диапазона движений пораженных суставов при пассивных манипуляциях. Собаки были разделены на две группы, контрольной группе было сделано три внутрисуставных инъекции глюкокортикостероидного препарата, с интервалом в неделю. Опытной группе было однократно введено ФАПЖТ. Анализ результатов был проведен в четыре этапа клинического и рентгенологического обследования, с изучением синовиальной жидкости (через 14 дней, 1, 2 и 3 месяца). Жировую ткань опытной группы отбирали из паховой складки, во время хирургических манипуляций по стерилизации и кастрации собак, методом липосакции, при этом, количество материала составляло

в среднем 20 грамм. Далее материал был отмыт в физиологическом растворе и пропущен через систему разработанных нами фильтров. Введение ФАПЖТ проводилось в пораженные суставы через 20 мин. после отбора жировой ткани. В конце эксперимента, репаративный эффект в опытной группе был значительно выше, как клинически, так и рентгенологически. Значительное улучшение клинических показателей опытной группы, в сравнении с показателями контрольной, доказывает, что использование внутрисуставных инъекций ФАПЖТ является новым и практичным методом купирования и лечения различных степеней ОА собак.

УПРАВЛЕНИЕ РОСТОМ АКСОНОВ НЕЙРОНОВ ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВОХ КЛЕТОК ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ

**Максим Александрович Вовченко¹,
Эрдэм Баирович Даширмаев²,
Кирилл Константинович Сухинич²**

¹ *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;*

² *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

maxvov@phystech.edu

Управление ростом аксонов нейронов человека *in vitro* является актуальной задачей современной нейробиологии и регенеративной медицины. При помощи подобной технологии возможно будет создавать клеточные транспланты, выращенные из нейронов человека, которые, в свою очередь, можно получить из аутологичных индуцированных плюрипотентных клеток человека. Такие транспланты могут быть применены для лечения травм спинного мозга и периферической нервной системы, которые являются нерешенными проблемами современной неврологии ввиду тяжести инвалидизации и отсутствия эффективных методов терапии. В предыдущих исследованиях нами были отработаны методы культивирования индуцированных плюрипотентных стеловых клеток человека и методы их дифференцировки в нейральных направлениях. Были получены культуры зрелых нейронов человека, содержащих небольшой процент глиальных клеток. Были отработаны методы культивирования нейральных стеловых клеток в виде нейросфер.

В исследовании по электростимуляции нейронов человека, полученных методом дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стеловых клеток человека, впервые удалось разработать метод по управлению направлением роста аксонов в первом приближении. Для этого была разработана экспериментальная установка электростимуляции нейронов оригинального дизайна. Показано, что что импульсный ток частотой 50 Гц и амплитудой 220 мВ/мм вызывает стимуляцию роста аксонов в катодном направлении, при этом угнетая рост аксонов в анодном направлении. Таким образом получена база для дальнейшего создания клеточных трансплантов с направленной ориентацией нервных волокон для лечения травм периферических нервов.

Работа была выполнена в рамках гранта Президиума РАН, ФИМТ 0108-2018-0010 «Разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов, основанной на использовании стеловых клеток различного генеза».

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СТАРЕНИЯ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

**Елизавета Сергеевна Войнова,
Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

voynovaes.pharm@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки представляют большой интерес для современной науки в связи с их потенциальным использованием в регенеративной медицине. Как стволовые клетки, они обладают способностью к самообновлению и дифференцировке — процессам, от которых зависит размер популяции и ее регенеративный потенциал. При исследовании старения МСК используются клетки, выделенные из доноров разного возраста, а также продолжительное пассирование клеток в культуре. Ранее было показано, что так называемое «время удвоения» популяции как на ранних, так и на поздних пассажах выше у пожилых доноров, а также значительно увеличивается с каждым последующим пассажем. Кроме того, отмечается снижение мультипотентности дифференцировки и проявление признаков репликативного старения.

Целью нашего исследования являлось выяснение того, как пролиферативная активность и дифференцировочный потенциал изменяется в процессе старения МСК жировой ткани человека. Мы измерили их митотическую активность и эффективность адипогенной дифференцировки в зависимости от возраста донора, при разной плотности посадки и на разных пассажах. Все изучаемые процессы наблюдались в режиме реального времени и на уровне одиночных клеток, что в совокупности с большим статистическим объемом данных позволило говорить о высоком уровне достоверности результатов.

В процессе исследования нам удалось выяснить, что при одинаковом пассаже клетки, высаженные в большей плотности, эффективнее переходят в адипогенную дифференцировку. Данное наблюдение подтверждалось для клеток как пожилых, так и молодых доноров. Вероятнее всего, данный эффект объясняется паракринными факторами, секретируемыми МСК. Кроме этого, нами была выявлена прямая зависимость дифференцировочного потенциала от номера пассажа культивируемых МСК. Так, по мере пассирования данный показатель возрастал в 4–5 раз. Эти данные позволяют говорить о том, что при старении МСК в большей степени подвержены адипогенной дифференцировке, что может быть связано с тем, что они выходят из состояния стеловости и коммитируются в направлении дифференцировки.

Таким образом, в данной работе был выявлен ряд закономерностей изменения МСК, понимание которых необходимо для контролируемого использования этих клеток в регенеративной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-315-80018.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Станислав Евгеньевич Волчков¹, Ольга Владимировна Тюмина¹, Павел Анатольевич Овчинников¹, Лариса Михайловна Трусова¹, Татьяна Александровна Романова², Ольга Олеговна Галахова²

¹ ГБУЗ «МЦ Династия», Самара, Россия;

² ГБУЗ СО «Самарская городская детская клиническая больница № 1 им. Н.Н. Ивановой», Самара, Россия

quality@cordbank.ru

Введение. Расстройства аутистического спектра (ASD, PAC) представляют собой психические расстройства, характеризующиеся нарушением социального взаимодействия и общения, повторяющимися и стереотипными моделями поведения и неравномерным интеллектуальным развитием, часто с умственной отсталостью, возникающие в детском возрасте. Определение эффективных методов лечения аутизма является особенно сложным. Терапия стволовыми клетками показала большие перспективы в современном лечении и реабилитации пациентов с PAC.

Материал и методы. Исследование проведено на 10 пациентах с подтвержденным диагнозом «Аутизм» после подписания информированного добровольного согласия. Возраст пациентов варьировался от 4 до 14 лет (медиана 7,25 лет). Подбор образцов пуповинной крови осуществлялся по группе крови по системе ABO и резус фактору из расчета не менее 150 млн ядросодержащих клеток на кг веса пациента. Введение осуществлялось внутривенно капельно. Всего выполнено 3 введения с интервалом в 1 месяц. Оценка эффективности лечения проводилась по шкале АТЕС (до введения, через 1 месяц после каждого введения); дополнительно, в крови пациентов изучали иммунный статус и цитокиновый профиль (IL 1,6,8, α -ФНО, γ -интерферону) до введения и через 6 месяцев после последнего введения.

Результаты исследования. На момент публикации тезисов оценка эффективности лечения проведена за первые три месяца протокола (3 введения). За период наблюдения и до момента публикации ни у одного из детей реакций на введение клеток пуповинной крови и других отсроченных осложнений не наблюдалось. Показатели цитокинового профиля до и после лечения были в пределах референтных значений. У некоторых пациентов были зафиксированы незначительные отклонения от референтных значений показателей иммунного статуса. После проведенного лечения данные показатели не претерпели значительных изменений. Оценка эффективности лечения по шкале АТЕС показала положительную динамику. В большей мере улучшение было отмечено в разделах: «Речь, язык, коммуникативные навыки» — снижение тяжести заболевания в баллах составило по медиане с 14 до 7 и «Здоровье/Физическое развитие/Поведение», где снижение составило по медиане с 24 до 14. Общее снижение тяжести заболевания составило около 30%, с 63 до 44 (Me).

Выводы. Полученные результаты показывают, что внутривенное введение гемопоэтических клеток пуповинной крови безопасно и эффективно влияет на физическую и психосоциальную реабилитацию детей с расстройствами аутистического спектра.

ПРОВЕРКА ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК ОТОБРАННЫХ МЕТОДОМ ХИМЕРНОГО СОРТИНГА

Ива Глебовна Воробьева¹, Татьяна Борисовна Карягина²

¹ ФГБУ «НМИЦ реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБУ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

iva1647@yandex.ru

Развитие генной терапии и Crispr/Cas9 метода геномной модификации клеток для клинического применения в клеточной трансплантологии требует новых подходов к отбору генетически измененных клеток. Вероятность инсертного мутагенеза из-за интеграции генно-инженерной кассеты в случайный сайт в геноме, остается достаточно высокой. Затрагивая гены, необходимые для нормального функционирования клетки, такая вставка будет делать клетку-хозяин патогенной. При трансплантации нескольких миллионов модифицированных клеток, в организм может быть введено до нескольких сотен потенциально патогенных клеток. Значительно снизить эту вероятность возможно получив стабильную, генетически однородную линию, проверенную на иммуногенность для пациента, с известным потенциалом клеточных делений после трансплантации. Прим.в конструкцию pEYFP-CBD-PDGFR мы получили стабильные генетически однородные клеточные линии.

Цель: проверить моноклональность полученных линий методом предельных разведений, сделать анализ клеточного пула методом ифа, исследовать возможность метода получать линии как с генотипической стабильностью, и сниженным фенотипическим разнообразием.

Материалы и методы. Трансфекция клеточной линии CHO-S проводили, используя липофильный агент FreeStyle MAX (Invitrogen) в 6-луночных планшетах (FreeStyle CHO-S Cells, Invitrogen, Cat. # R800-07). Проверку моноклональности стабильных клонов проводили методом предельных разведений. Концентрацию EYFP определяли ифа анализом Anti-GFP antibody Cat. # ABO11 (Евроген, Россия).

Результаты: Из $0,5 \times 10^6$ клеток получивших трансген трансфектантов, были получены клеточные линии с высокой, стабильной (20–35 пассажей) экспрессией модельного белка. Концентрация целевого белка в неоптимизированных условиях после трех дней культивирования трех производительных клонов достигла (мг/л): $72,7 \pm 3,2$; $83,5 \pm 12,1$; $380,4 \pm 14,5$. Скорость роста линий при этом составляла (часов/деление): $19,7 \pm 1,1$; $22,1 \pm 1,4$; $22,2 \pm 1,2$. Стабильная линия может быть получена уже через 15 суток после трансфекции. Безопасность для организма-хозяина линии, стабильность, параметры вставки и соответствие необходимым характеристикам могут быть проанализированы одновременно с наработкой необходимого для применения количества клеток.

Выводы. При использовании этой селективной системы возможна эффективная селекция генетически модифицированных клеток с генотипической стабильностью, и сниженным фенотипическим разнообразием метаболизм которых минимально отличается от исходных клеток организма.

КОНДИЦИОНИРОВАННАЯ СРЕДА С СЕКРЕТИРУЕМЫМ hBMP-2 КАК ОСНОВА ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ MSC, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИХ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Ива Глебовна Воробьева, Петр Серафимович Еремин, Ильмира Ренатовна Гильмутдинова
ФГБУ «НМИЦ реабилитации и курортологии»
Минздрава России, Москва, Россия

iva1647@yandex.ru

Костные морфогенетические факторы роста (BMP) — группа цитокинов формирующая ткани кости и хряща. Рекомбинантный костный морфогенетический белок-2 (rhBMP-2) является ортобиологическим, способствует образованию кости и сращению позвоночника, используется в хирургических подходах однако имеет много побочных эффектов, так как может вызывать воспаления, малигнизацию и остеолитиз. Управление по санитарному надзору FDA (США) выпустило предупреждение об опасных побочных эффектах, связанных с использованием rhBMP-2. Обзор 2011 года выявил занижение числа побочных явлений, включая риск развития рака. В последнее время клеточная терапия стала потенциальным вариантом лечения, способствующим восстановлению кости. Остеогенная способность стволовых клеток из жировой ткани в качестве терапевтического агента для восстановления кости описана в литературе. В работе мы анализировали данные экспрессии введенного трансгена hBMP-2 в две клеточные линии, чтобы оценить возможность использовать кондиционированную среду на их основе для трансформации человеческих MSC, полученных из жировой ткани, для усиления их остеогенного потенциала.

Материалы и методы. Вектор, содержащий синтетическую конструкцию BMP2, вводился в культуру HEK-293 и контрольные клетки CHO методом липофекции. Экспрессию гена на уровне транскрипции подтверждали методом ОТ-ПЦР. HEK293 оценку экспрессии трансгена в клетках определяли детекцией моноклональными антителами к BMP-2 (Pierce, MA1-26766) вестерн-блота, микроскопированием и оценкой при помощи программы ImageJ.

Результаты и обсуждение. Продукция BMP-2 в культуральной жидкости CHO (контроль) была около $0,1-3 \text{ нг}/10^6$ клеток как предел детектируемого сигнала, и BMP-2 — HEK2, продуцирующей приблизительно $20 \text{ нг}/10^6$ клеток BMP-2 в течение 3 дней (пятая часть от контрольного нанесения на блоте), что соответствует литературным данным. Трансген в клетках млекопитающих демонстрирует устойчиво низкую выработку BMP-2, что должно приводить длительному периоду полужизни остеоиндуктивного сигнала и, таким образом, к увеличению дифференцировки остеопрогениторных клеток из MSC, полученных из жировой ткани, для усиления их остеогенного потенциала.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ПРИ ТРАВМАХ СПИННОГО МОЗГА

Анастасия Денисовна Воронова¹, Ольга Владиславовна Степанова¹, Марат Петрович Валихов¹, Андрей Викторович Чадин¹, Екатерина Константиновна Карсунцева¹, Алевтина Сергеевна Семкина¹, Игорь Владимирович Решетов², Владимир Павлович Чехонин¹

¹ Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва, Россия;

² Университетская клиническая больница № 1, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

nastyanastyav@mail.ru

Травмы спинного мозга занимают лидирующие позиции среди всех причин инвалидизации населения планеты. Патологические процессы, развивающиеся в результате травм спинного мозга, связаны с гибелью большого числа функциональных зрелых нейронов и приводят к тяжелым нарушениям моторных, сенсорных, дыхательных и мочеполовых функций. Важнейшей задачей современной биомедицины является поиск новых стратегий лечения таких пациентов, так как существующие хирургические и медикаментозные методы остаются малоэффективными. Перспективным в этой области является такое направление регенеративной медицины, как клеточная терапия. С точки зрения персонализированной медицины оптимальными рассматриваются клетки обонятельной выстилки носа, а именно обкладочные клетки и нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК). Однако применение комбинации данных клеток в терапии травм спинного мозга, в том числе, при посттравматических кистах не изучено. Таким образом, целью данной работы было получить комбинированный препарат клеток обонятельной выстилки и изучить его эффективность при посттравматических кистах спинного мозга.

Для создания комбинированного препарата применяли протоколы получения чистых культур обкладочных клеток и НСПК человека, разработанных ранее в нашем отделе. Трансплантацию комбинированного препарата проводили животным через 4 недели после травмы в полость кисты в 10 мкл среды DMEM/F12(1:1). Контрольной группе вводили то же количество среды без клеток. Оценку восстановления моторной функции проводили в течение 4 недель после трансплантации с помощью BBB-теста.

Оптимальный состав комбинированного препарата клеток обонятельной выстилки для терапии посттравматических кист спинного мозга включал 750 тысяч обкладочных клеток и 200 тысяч НСПК. Данные количества обусловлены тем, что в ранее был показан наибольший терапевтический эффект от трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток человека, а 200 тысяч НСПК рекомендуется использовать согласно литературным данным. По результатам BBB-теста было показано, что при трансплантации комбинированного препарата наблюдали положительную динамику восстановления двигательной активности в течение всех 4 недель по сравнению с контрольной группой. Разработанный комбинированный препарат и выявленная эффективность его использования в терапии экспериментальных кист спинного мозга являются предпосылкой для дальнейшего использования в доклинических и клинических испытаниях при травмах спинного мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01133.

ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИНГА ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СПОСОБНОСТЬ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Мария Владимировна Воронцова^{1,2},
Константин Юрьевич Кулебякин^{2,3}, Лейла Салиховна Созаева^{1,2}, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин³, Никита Сергеевич Волошин³, Антон Александрович Картошкин³, Александра Александровна Королева³, Дмитрий Кузьмич Мартынов³

¹ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

maria.v.vorontsova@mail.ru

Паратиреоидный гормон (ПТГ) играет важную роль в пролиферации и дифференцировке предшественников остеобластов и мезенхимных стромальных клеток (МСК).

Цель исследования: обнаружение особенностей сигналинга ПТГ в МСК и влияние на их дифференцировку

Методы: получены МСК из жировой ткани брюшной стенки, колена и надкостницы. Функциональная активность рецепторов ПТГ на МСК исследована при помощи детекции внутриклеточного кальция с использованием кальциевого красителя Fluo8. Для индукции остеогенеза использовано 100 нМ Дексаметазона, 200 мкМ Аскорбиновой кислоты и 10 мМ Глицерол-2-фосфата в присутствии или без ПТГ, и селективных ингибиторов фосфолипазы С (U73122) и Аденилатциклазы (SQ22536). RUNX2 и остеокальцин оценены при помощи ПЦР с обратной транскрипцией. Также дифференцировку визуализировали цитохимическим окрашиванием ализариновым красителем.

Результаты. Обнаружено, что МСК отвечают на ПТГ различными типами кальциевых ответов: одиночный ответ в течение первых мин. после стимуляции, отложенный одиночный ответ, регулярные кальциевые осцилляции, нерегулярные кальциевые осцилляции, постепенное повышение уровня кальция. Обнаружены особенности распределения функциональных субпопуляций МСК по типам их ответов на ПТГ в зависимости от ткани, из которой они выделены. Клетки из надкостницы чаще отвечали регулярными кальциевыми осцилляциями. Некоторые клетки осциллировали и в отсутствие ПТГ, а добавление гормона повышало частоту осцилляций. Клетки из жировой ткани брюшной стенки отвечали одиночными кальциевыми всплесками или медленными кальциевыми цАМФ-зависимыми ответами. МСК из подкожного жира колена демонстрировали все типы кальциевых ответов.

При дифференцировке клеток в остеогенном направлении ПТГ оказывал разные эффекты на МСК: проостеогенное действие на МСК из жировой ткани брюшной стенки и подавление остеогенной дифференцировки и уменьшение экспрессии остеогенных маркеров при действии на клетки из надкостницы. На МСК из жировой ткани колена эффект был антиостеогенным, но менее выраженным

Выводы. Обнаружена функциональная гетерогенность МСК по типам их ответов на ПТГ, а также зависимость субпопуляционного состава МСК по ответу на ПТГ в зависимости от источника выделения клеток.

Обнаружено, что ПТГ оказывает положительный эффект на остеогенную дифференцировку МСК, выделенных из жировой ткани брюшной стенки и подавляет остеогенную дифференцировку МСК, выделенных из надкостницы и из жировой ткани колена.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30007.

АПОПТОЗ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В АУТОАГРЕССИИ ОДОНТОБЛАСТОВ И ЕГО МОДЕРАЦИЯ

Юлия Сергеевна Высочанская,
Сергей Валентинович Моргунов

ООО Соматическая Стоматология, МО, Балашиха, Россия

zlider@inbox.ru

В предыдущих работах мы показали невозможность биологического лечения кариеса (предотвращение синтеза матриксных металлопротеиназ одонтобласти и дифференцировка в третичный дентин стволовыми клетками преддентина) без предотвращения апоптоза эпителия.

Цель исследования: разработать композицию, предотвращающую апоптоз эпителиоцитов и аутоагрессию одонтобластов

Материалы и методы. Лабораторная часть. На базисном воске 7 дней при t 37°C культивировали по 3 образца интактных зубов. Эксперимент воспроизвели 3 раза. Всего 27 зубов. Среды культивирования: со слюной и взвесью клеток эпителия полости рта и 50% сиропом сахара (гр. 1), со смывом полости рта 50% сахарным сиропом после чистки образцов реминерализующей зубной пастой (гр. 2), со смывом полости рта 50% сахарным сиропом после чистки образцов разработанной нами композицией (гр. 3).

Клиническая часть. В эксперименте приняли участие 28 добровольцев в возрасте 18–29 лет, 14 мужчин и 14 женщин. У всех добровольцев были взяты мазки до и через 7 дней после эксперимента: эмаль без кариеса, эмаль с поверхностным кариесом, эмаль с начальным кариесом, кариес дентина, межзубной промежутков, десневой край, буккальный мазок. Добровольцы (по 7 человек) чистили зубы: зубной пастой Blend – a – Med (гр. 2.1), Colgate (гр. 2.2), Paradontax (гр. 2.3) и нашей композицией (гр. 2.4). Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel.

Результаты. В группе 1 отмечалось резкое потемнение и размягчение дентина. В группе 2 – значительная деминерализация эмали. В группе 3 каких-либо изменений со стороны эмали и дентина отмечено не было.

В клиническом эксперименте было получено значительное количество апоптозных эпителиоцитов во всех группах до начала эксперимента (9 +/- 6 в поле зрения). На стадии начального кариеса эмали в группах 2.1, 2.2 и 2.3 количество апоптозных эпителиоцитов составило 7 (+/- 3 в п. з.). В группе 2.4 количество апоптозных эпителиоцитов составило 2 (+/- 1 в п. з.).

Вывод. Эпителий слизистой полости рта при выделении продуктов апоптоза может активировать ММП дентина, тем самым провоцируя появление скрытых кариозных полостей. Одонтобласти и стволовые клетки преддентина могут отвечать на кариозное поражение как аутолизисом (путем синтеза ММП одонтобласти), так и аутопротекцией (активации стволовых клеток преддентина и формированием третичного дентина). Реакцию одонтобластов и стволовых клеток преддентина можно модерировать путем предотвращения процесса апоптоза эпителиоцитов на поверхности эмали зуба.

РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ НОКДАУНА ГЕНА ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ КИНАЗЫ-3 β

Елена Валерьевна Галицына, Татьяна Борисовна Бухарова, Анастасия Витальевна Бобылева, Александр Сергеевич Дьяконов, Ирина Александровна Кривошеева, Михаил Юрьевич Скоблов, Дмитрий Вадимович Гольдштейн

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», Москва, Россия;

snowbars888@yandex.ru

Актуальность. Разработка новых методов восполнения дефектов костной ткани, направленных на регуляцию дифференцировки остеогенных прогениторных клеток, является актуальной задачей регенеративной медицины. Одним из ингибиторов остеогенеза выступает гликогенсинтаза киназа GSK-3 β , который посредством фосфорилирования β -катенина уменьшает уровень экспрессии ключевого транскрипционного фактора остеобластов Runx2. Снижение количества мРНК GSK-3 β в результате нокдауна с помощью молекул siРНК может существенно повысить эффективность остеогенной дифференцировки клеток-предшественниц в процессе репаративного остеогенеза.

Цель исследования. Оценка влияния нокдауна GSK-3 β на развитие остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Материалы и методы. Для нокдауна GSK-3 β были выбраны 4 молекулы siРНК, направленные на 4, 7, 8 и 10 экзоны в составе мРНК данного гена. ММСК жировой ткани человека на 3 пассаже инкубировали с полиплексами, состоящими из молекул siРНК и полимера TurboFect (TF) N/P 1:2 в 24-луночном планшете в течение 24 часов в среде Opti-MEM с 5% ЭТС. После трансфекции среду заменяли на ДМЕМ с 10% ЭТС, 4 mM L-глутамин, 100 мг/л амикацин. Эффективность трансфекции определяли с помощью контрольной молекулы siРНК, не направленной ни на один известный ген человека, с флуоресцентной меткой 6-FAM. Цитосовместимость полиплексов анализировали с помощью МТТ-теста на 1, 2 и 5 сутки после трансфекции. Уровень экспрессии мРНК GSK-3 β и Runx2 оценивали с помощью РТ-ПЦР.

Результаты. По данным МТТ-теста была определена оптимальная концентрация siРНК — 50 пмоль/мл, при которой количество живых клеток на 5 сутки после трансфекции варьировалось от 71,7% до 87% от значений контрольной группы.

Эффективность трансфекции ММСК полиплексами, содержащими 50 пмоль/мл siРНК составила 97,2 \pm 2,4%. На 5 сутки после проведения нокдауна уровень экспрессии GSK-3 β снизился в 2,3–5,2 раза, а уровень экспрессии Runx2 вырос в 2,5–7 раз в зависимости от молекулы siРНК.

Таким образом, было показано, что эффективность остеогенной дифференцировки в культурах ММСК может быть повышена при нокдауне гена GSK-3 β с помощью молекул siРНК.

Работа выполнена при поддержке госзадания для ФГБНУ «МГНЦ».

ПРОАНГИОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫМИ АДЕНОВИРУСАМИ

Дилара Зильбаровна Гатина¹, Екатерина Евгеньевна Гаранина¹, Маргарита Николаевна Журавлева¹, Ильназ Марселевич Газизов², Ильнур Ильдусович Салафутдинов¹

¹ Институт Фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Кафедра анатомии нормальной, Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия

sal.ilnur@gmail.com

К настоящему времени предложено множество подходов для индукции терапевтического ангиогенеза включающие в себя разнообразные хирургические техники, применение специфических медикаментозных препаратов, белков индукторов ангиогенеза, рекомбинантных молекул ДНК и применение различных клеточных типов. При этом в качестве наиболее перспективных технологий могут рассматриваться подходы базирующиеся на использовании *ex vivo* генетически модифицированных клеток. В этом аспекте, мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека продолжают оставаться перспективными «инструментами» для доставки генно-инженерных систем и экспрессии рекомбинантных белков.

В исследовании мы определили влияние МККП гиперэкспрессирующих проангиогенные факторы на процессы индукции ангиогенеза. Получены МККП экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), а также МККП одновременно секретирующие VEGF, основной фактор роста фибробластов (FGF2) и стромальный фактор роста 1 альфа (SDF1- α) (МККП-VSF). В качестве групп сравнения использовали импланты матригеля с МККП-GFP и без МККП.

Спустя семь суток после имплантации выделенные фрагменты Матригеля имели вид правильных дисков. Верификация экспрессии рекомбинантных генов в имплантах, показала присутствие целевых мРНК. Цвет имплантов коррелировал со степенью васкуляризации и варьировал от молочного-белого (контрольный Матригель) до красно-коричневого (МККП-VSF). Показано, что концентрация гемоглобина в имплантах, содержащих МККП-VEGF, или МККП-VSF достоверно выше по сравнению с образцами содержащими фрагменты Матригеля с МККП-GFP и без МККП. Гистологические исследования выявили, что препараты Матригеля окружены тонкой соединительнотканной капсулой в глубь которых врастает соединительная ткань. В группах Матригеля без МККП (1,5 \pm 0,5 ед./мм²) и МККП-GFP (7,5 \pm 3 ед./мм²) наблюдались редкие капилляры. В группе МККП-VEGF присутствуют сосуды различного диаметра (16 \pm 5 ед./мм²), проникающие в центральные области имплантата, клетки экспрессируют VEGF. МККП-VSF характеризуются вращением в глубь имплантатов соединительной ткани и формированием сосудов (23 \pm 5 ед./мм²) различного калибра, которые проникают в центральные области имплантата, МККП позитивны в отношении VEGF, FGF2 и SDF1- α .

Таким образом, модификация МККП аденовирусами увеличивает экспрессию ими проангиогенных факторов.

Комбинируемая доставка нескольких факторов с использованием МККП показывает взаимный синергетический эффект при стимуляции ангиогенеза.

Работа поддержана РФФИ 16-04-01567.

АКТИВАЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИГЕННЫХ СИСТЕМ

Дилара Зильбаровна Гатина, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов, Альберт Анатольевич Ризванов

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

gatinadilara2013@gmail.com

В настоящее время активно разрабатываются методы лечения сосудистых заболеваний в основе которых лежат методы стимулирования естественных процессов ангиогенеза. В частности, генные конструкции, экспрессирующие проангиогенные факторы были успешно применены во многих клинических и доклинических исследованиях. Использование сильных промоторов и мультигенных систем, позволяет усиливать ангиогенный потенциал и активировать формирование стабильной функциональной сети сосудов.

В исследовании на базе разрешенного для клинического применения плазмидного вектора pVax1 нами были сконструированы генетические конструкции, кодирующие несколько генов интегрированные через фурин-2А-пептидные последовательности пикорновирусов. В качестве терапевтических молекул, были выбраны VEGF и (или) FGF-2, оба фактора играют важную роль на разных этапах ангиогенеза, все экспрессионные каскады кодируют репортерный ген- DsRed.

Генетически модифицированные клетки трансфицированные созданными плазмидами, стабильно экспрессировали рекомбинантные факторы. Синтез мРНК VEGF и FGF-2 был подтвержден с помощью молекулярно-генетических методов. Данные мультиплексного анализа с применением технологии Luminex[®]xMAP и набора Bio-PlexPro[™] Human Cytokine 27-plex Assay показали, что модификация клеток не приводит к значительному сдвигу в профиле синтезируемых и секретуемых факторов. За исключением, концентрации рекомбинантных белков представленных в плазмидных конструкциях (VEGF и FGF2). Кондиционированная среда собранная с трансфицированных клеток оказывала стимулирующий эффект на пролиферацию и формирование капиллярно-подобных структур эндотелиальными клетками *in vitro*.

Таким образом, рекомбинантные конструкции содержащие 2А-пептидные последовательности пикорновирусов экспрессируют терапевтические и репортерные гены, расположенные в одной рамке считывания и обладают значительным проангиогенным потенциалом. Данные системы позволяют расширить существующие возможности генной терапии в аспекте лечения ишемических заболеваний человека.

Работа поддержана Грантом Президента РФ ПВНШ-118.

ВЛИЯНИЕ КО-ЭКСПРЕССИИ VEGF И FGF-2 НА ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА IN VIVO

Дилара Зильбаровна Гатина, Маргарита Николаевна Журавлева, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов, Альберт Анатольевич Ризванов

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

gatinadilara2013@gmail.com

По данным ВОЗ основной причиной смертности населения в развитых странах являются сердечно-сосудистые заболевания, каждый год из-за них погибает около 17,9 миллиона людей. Несмотря на совершенствование хирургических и эндоваскулярных технологий, данные методы лечения недоступны около 30% пациентов из-за плохого состояния сосудистого русла и риска сердечного приступа. В связи с этим поиск эффективных методов лечения, способных предотвратить прогрессирование ишемических заболеваний остается актуальной задачей здравоохранения. Генная терапия с использованием проангиогенных молекул является прогрессивной стратегией, однако последние рандомизированные исследования не смогли однозначно доказать эффективность данного подхода. Поэтому существует необходимость в более детальном изучении влияния генных конструкций на активацию естественных процессов ангиогенеза.

В этой связи, нами были созданы и протестированы мультигенные плазмидные конструкции *in vitro*. Рекомбинантные плазмиды содержали фурин-2А-пептидную последовательность пикорновирусов и кодон оптимизированные последовательности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и (или) фактора роста фибробластов (FGF2), красного флуоресцентного белка (DsRed). В данной работе, для анализа терапевтического потенциала данных конструкций *in vivo* мы имплантировали генетически-модифицированные клетки HEK293T в составе матригеля иммунодефицитным мышам линии BALB/c Nude.

Имплантаты контрольных групп характеризовались молочно-белым цветом и низким уровнем гемоглобина. Тем не менее, в имплантатах, содержащих клетки HEK293T, трансфицированные репортерной плазмидой pVax-DsRed, содержание гемоглобина было выше, чем в чистом Матригеле, что говорит о наличии некоторых проангиогенных свойств у клеток HEK293T. Клетки, гиперэкспрессирующие VEGF и FGF-2 активировали ангиогенез: красно-коричневые имплантаты матригеля содержали большое количество кровеносных сосудов. Однако в группе pVax-FGF2 уровень гемоглобина был выше по сравнению с группой pVax-VEGF-FGF2. Под воздействием pVAX-FGF2 формировалось меньшее количество сосудов по сравнению с pVax-VEGF165A-FGF2, однако диаметр был их шире, что повлияло на концентрацию гемоглобина.

Таким образом, ко-экспрессия VEGF и FGF-2 способствует эффективной васкуляризации имплантатов матригеля и стимулирует образование сосудов *in vivo*, а разработанные плазмидные конструкции могут быть использованы в дальнейших исследованиях направленных на стимулирование ангиогенеза.

Работа поддержана Грантом Президента РФ ПВНШ-118.

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА В СРЕДЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ДИОКСИДА УГЛЕРОДА

Эльвира Разитовна Гафарова¹, Алексей Эдуардович Лажко², Илья Александрович Бажанов¹, Байрон Симбараше Капомба¹, Анастасия Сергеевна Курьянова^{1,2}, Екатерина Андреевна Гребеник¹, Петр Сергеевич Тимашев¹⁻³

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

² Отдел полимеров и композиционных материалов, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия;

³ Институт фотонных технологий РАН Федерального Научно-исследовательского Центра «Кристаллография и Фотоника» РАН, Москва, Россия

alvira.1993@mail.ru

Патология аортального клапана остается одной из важнейших проблем сердечно-сосудистой хирургии. Недостатки существующих протезов требуют поиска новых решений для пациентов в терминальной стадии заболевания. Наиболее перспективным направлением является децеллюляризация клапанов сердца.

Нами была предпринята попытка децеллюляризации в среде сверхкритического диоксида углерода (скСО₂), что по данным ряда авторов может сократить время обработки и снизить риск контаминации. Эффективность способа оценивали методами гистохимического окрашивания (окраска гематоксилин-эозином) и определением биомеханических свойств клапанов.

Децеллюляризация раствором щелочи в течение 1–1,5 часа и последующее помещение образцов в среде скСО₂ (t=37 °C, P=15 МПа) способствовали вымыванию клеток из тканей, однако отмечалось повреждение экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). При обработке в среде скСО₂ в течение 1 часа с добавлением раствора этилового спирта в концентрации от 30% до 64% наблюдалось сохранение ядер в биоматериале.

Гибридная обработка растворами детергентов в течение 24 часов и последующая экстракция в среде скСО₂ (t=37 °C, P=15–25 МПа) позволила добиться удаления клеток при сохранении структуры ЭЦМ. Механические испытания показали незначительное увеличение модуля Юнга, максимального напряжения и удлинения в обработанной ткани по сравнению с нативной. Таким образом, комбинированная обработка (детергент+скСО₂) позволяет получить бесклеточные неповрежденные матрицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-33-00982.

БЕЗФИДЕРНАЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ГУБЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РОГОВИЦЫ

Максим Юрьевич Герасимов¹, Дмитрий Сергеевич Островский¹, Борис Эдуардович Малюгин¹, Сергей Анатольевич Борзенков^{1,2}

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова», Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Москва, Россия

gerasimovmy@mntk.ru

Введение. Роговица человека в норме покрыта нероговевающим многослойным плоским эпителием, который обновляется за счет лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК). Обширное повреждение ЛЭСК, приводит к синдрому лимбальной недостаточности (СЛН), а его двусторонняя форма вызывает слепоту и слабовидение. Для лечения таких состояний изучается эффективность аутотрансплантации культивированных клеток эпителия полости рта.

Цель. Разработка метода получения культуры клеток эпителия слизистой губы человека без фидерных клеток и биопокрытий.

Материалы и методы. Ткань слизистой губы была получена от 6 пациентов при выполнении оперативных вмешательств после подписания информированного добровольного согласия. Для посева использовали эпителиальную часть экспланта, отсепанованную от подслизистого слоя. Культивирование проводили в базовых средах DMEM/F12 (1,05 mM кальция) и EpiLife (0,06 mM кальция), содержащих 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% антибиотик-антимикотик, а также инсулин, гидрокортизон и эпидермальный фактор роста. Первичную культуру окрашивали на маркеры: p63 (стволовость, пролиферация), виментин (промежуточные филаменты) и ZO-1 (плотные межклеточные контакты тип 1). Изображения анализировали в программах Fiji и CellProfiler.

Результаты. Первичная культура клеток эпителия слизистой губы была получена от всех доноров в обеих культуральных средах. Морфология клеток соответствовала типу «булыжная мостовая», однако в среде с 1,05 mM кальция отмечали больше открепившихся клеток и наличие дебриса. Количество клеток, положительных на ядерный маркер p63, в средах DMEM/F12 и EpiLife составило 34,7% и 39,2% (медиана, n=3) соответственно. Экспрессия виментина в группах значимо не различалась. По данным анализа, длина участков экспрессии белка ZO-1 составила 17,05 и 5,18 мкм на клетку (медиана, n=3) в средах DMEM/F12 и EpiLife соответственно.

Заключение. По результатам проведенного исследования были получены культуры клеток эпителия слизистой губы человека без применения фидерных клеток и биопокрытий с использованием только трёх специфических фактора роста. При культивировании в среде DMEM/F12 отмечено повышение длины плотных межклеточных контактов, что может быть использовано при моделировании дифференцировки эпителия in vitro. Культивирование в среде EpiLife способствует повышению количества пролиферирующих клеток эпителия. Следовательно, описанный метод перспективен для использования в клеточной трансплантации у пациентов с двусторонним СЛН.

ПРЕИМУЩЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ ТЕХНОЛОГИИ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО РАЗВИВШЕГОСЯ ПАРОДОНТИТА

Ирина Валериевна Гилевич¹, Владимир Борисович Карпюк¹, Марина Дмитриевна Перова², Владимир Алексеевич Порханов³

¹ Лаборатория разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний, ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» МЗ КК, Краснодар, Россия;

² ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия;

³ ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» МЗ КК, Краснодар, Россия

vkarpjuk@mail.ru

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция жировой ткани, хронический пародонтит, хирургическое лечение

Цель. Оценить эффективность инновационного подхода со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани (СВФ-ЖТ) для восстановления опорного аппарата зуба у пациентов хроническим пародонтитом, включая длительно курящих.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 158 больных хроническим развившимся пародонтитом, из них тестовая группа (ТГ) — 95 человек, контрольная группа (КГ) — 63; из них, 39 пациентов — 26 муж., 13 жен., в возрасте M_o 49,5 лет (со стажем курения > 15 лет, \geq 10 сигарет в день): в ТГ-18 пациентов, в КГ — 21.

Операции направленной регенерации тканей в ТГ выполняли с СВФ-ЖТ, в КГ под сгустком крови из альвеолы и периодонта. В обеих группах использовали остеокондуктивный материал. Наблюдение составило 24 месяца и включало клиническую и инструментальную оценку, морфологический анализ регенерата.

СВФ-ЖТ выделяли из липоаспирата ферментативным методом с дальнейшим протоколом выделения клеток в лаборатории клеточных технологий.

Результаты. Применение СВФ-ЖТ значительно улучшило клинические и функциональные результаты лечения. Частота послеоперационных осложнений оказалась ниже в ТГ по сравнению с КГ — 2,1% и 19,1%, соответственно ($p < 0,05$). Прирост зубодесневого прикрепления (ЗДП) через 2 года — в ТГ $5,66 \pm 0,02$ мм, что на 73% больше показателя КГ ($p < 0,001$). Аппаратная периотестометрия свидетельствовала о приемлемом восстановлении ЗДП у пациентов с СВФ-ЖТ в отличие от КГ. В группе длительно курящих прирост ЗДП (с СВФ-ЖТ) составил $4,3 \pm 0,02$ мм, в контроле — $2,1 \pm 0,01$ мм (при $p < 0,01$).

Морфологическое исследование биопсий в ТГ выявило вновь сформированные структуры пародонта с новым соединительнотканым прикреплением, образованием молодых, хорошо васкуляризованных альвеол. Среднее значение плотности микрососудов на срезах регенерата составило для ТГ и КГ: $58,2 \pm 10,2$ и $30,1 \pm 7,5$ единиц на 1 мм^2 , соответственно ($p = 0,047$).

Заключение: полученные результаты продемонстрировали индуцирующее влияния СВФ-ЖТ на восстановление опорного аппарата зуба, включая длительно курящих пациентов.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА К ЛЕЧЕНИЮ ОЖГОВОЙ РАНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Ирина Валериевна Гилевич¹, Александр Сергеевич Сотниченко², Андрей Владимирович Поляков³, Сергей Борисович Богданов³, Карина Игоревна Мелконян², Лариса Афанасьевна Медведева³, Владимир Алексеевич Порханов³

¹ Лаборатория разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний, ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» МЗ КК, Краснодар, Россия;

² Лаборатория фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИЛ, ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия;

³ ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1» МЗ КК, Краснодар, Россия

giliv@list.ru

Цель. Провести сравнительный морфологический анализ результатов комплексного подхода к лечению ожоговой раны с применением дермальных фибробластов в разные дни наблюдения.

Материал исследования. Гистологические препараты биоптатов ожоговой раны на 0, 4 и 7-е дни после аутопластики, полученных от пациентов с ожоговой травмой более 15% и 2–3 степенью. Было выделено 2 группы гистопрепаратов: тестовая группа (ТГ) образцов раны с применением аутологичных дермальных фибробластов 2 пассажа непосредственно перед аутопластикой, и контрольная группа (КГ) без применения клеток. Для морфологического анализа использовали окрашивание срезов с помощью гематоксилин и эозина, иммуногистохимический анализ проводили с антителами к виментину, CD31, CD68, коллагену 4, анти-токератину. Исследование проводили после одобрения локальным этическим комитетом.

Результаты. Непосредственно перед аутопластикой дно раны имело схожую картину во всех случаях и было представлено рыхлой волокнистой тканью, пропитанной фибрином, отечными периваскулярными пространствами, пустыми сосудами.

На 4 сутки после аутопластики в образцах ТГ произошла полная эпителизация раны, подтвержденной экспрессией панцитокератином, с появлением новой дермы толщиной до 50 мкм, с незначительными воспалительными изменениями в подлежащих слоях.

В отличие от образцов ТГ в КГ отмечается выраженная воспалительная реакция, проникающая вглубь до гиподермы с очагами кровоизлияний, воспалительный инфильтрат представлен клетками лимфо-макрофагального ряда, CD68⁺-клетки рассеяны диффузно очагово, экспрессия виментина обнаружена как в фибробластоподобных клетках, так и в клетках воспалительного ряда, имеются единичные островки эпителия.

В период на 7–9 сутки был сформирован полнослойный эпителий с новой дермой как в ТГ, так и в КГ. Однако толщина дермы в ТГ доходит до 200 мкм, а в КГ до 100 мкм. Элементы воспаления отсутствуют в обеих группах. В дерме ТГ более выражены регенеративные процессы: богатый клеточный состав, увеличено количество фибробластов, выражена пролиферация клеток в базальном слое. В отличие от КГ эпидермис имеет больше слоев, наблюдаются островки пролиферации эпидермиса.

Заключение. Данные гистоморфологического сравнительного анализа демонстрируют преимущества при использовании аутологичных дермальных фибробластов в комплексе с аутопластикой: раньше начинается ячеистая эпителизация, сокращается период воспалительной реакции, выше скорость регенерации.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

**Ильмира Ринатовна Гильмутдинова¹,
Регина Димьяновна Мустафина²,
Петр Серафимович Еремин¹**

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГАОУ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

gilm.ilmira@mail.ru

Лечение ран различной этиологии консервативными методами не всегда приводит к ожидаемым результатам. В связи с этим требуется разработка новых современных раневых покрытий, способствующих более эффективно-му лечению и регенерации кожных покровов. Важным требованием к созданию биопластических материалов является их адгезивность, пластичность, биосовместимость, максимальная приближенность по фиброархитектонике к тканям организма и биологическая активность, позволяющая достигать определенного фармацевтического эффекта от применения. Среди таких продуктов особое внимание заслуживают материалы на основе коллагена и гиалуроновой кислоты — главных компонентов внеклеточного матрикса, которые принимают участие в восстановлении поврежденных структур дермы.

Материалы и методы. Исследуемый биоматериал был получен при помощи фотохимической сшивки гидрогеля. Состав гидрогеля: коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, в пропорции, равной соотношению в дерме взрослого человека. Для оценки цитотоксичности и биосовместимости материала на исследуемые образцы пассировали культуру клеток фибробластов человека, исходя из концентрации 20×10^3 кл./см², выдерживали 30 мин., заливали ростовой средой (DMEM Н/г, 10% FBS). Помещали в CO₂ инкубатор (37°C, 5% CO₂). Визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа на 5-ые сутки культивирования. Клетки окрашивали с помощью ДНК-красителя Хехст.

Результаты и обсуждение. Полученное раневое покрытие характеризуется высокой пористостью (размер пор 100–200 мкм), эластичностью и стабильностью в физиологическом растворе. Через 24 часа культивирования фибробластов на биоматериале отмечалось отсутствие мертвых и слущенных клеток в ростовой среде. На 5 сутки культивирования клетки образовывали плотный монослой. Данный эффект достигается благодаря структуре биоматериала, который создает оптимальное микроокружение для клеток, обеспечивая тем самым хорошую пролиферацию.

Выводы. Разработанное раневое покрытие благодаря своей структуре и составу обеспечивает эффективные условия для хорошей пролиферации клеток, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного биоматериала для использования в клинической практике.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

**Екатерина Андреевна Голикова,
Ирина Вячеславовна Андрианова,
Людмила Борисовна Буравкова**

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

eagolikovamsu@gmail.com

В пилотируемых космических полётах и в экспериментах на биоспутниках выявлено замедление гемопоза. В исследованиях *in vitro* при воздействиях как реальной, так и моделируемой микрогравитации в стромальных предшественниках (МСК) происходят значительные изменения, которые могут влиять на формирование специфического гемопоз-индуцирующего микроокружения. В данной работе впервые с использованием модели клеточной ниши гемопоз-тических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) и 3D-клиностабилизации показаны морфологические и физиологические особенности межклеточного взаимодействия стромальных и гемопоз-тических клеток.

После сокультивирования МСК, выделенных из жировой ткани, и мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК), изучали суспензионные ГСПК, и ГСПК, ассоциированные с МСК. Для моделирования эффектов микрогравитации сокультуру МСК и гемопоз-тических предшественников помещали на 4 дня в 3D-клиностаб (Random Positioning Machine — RPM). Оценивали способность клеток образовывать колонии в полужидкой среде MethoCult H4034. Ассоциаты ГСПК с МСК, окрашивали по Гимзе и использовали для подсчета областей «булыжной мостовой». Иммунофенотипический анализ суспензионных клеток и МСК-ассоциированных ГСПК проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD Accuri[®] C6.

При моделировании микрогравитации в сокультуре не наблюдали достоверных отличий в количестве амплифицированных суспензионных ГСПК по сравнению со статическим контролем. Анализ суспензионных ГСПК при их культивировании в полужидкой среде MethoCult H4034 выявил увеличение в 1,5 раза количества бурст-образующих единиц (БОЕ), являющихся наименее дифференцированными предшественниками эритроидного ряда. При этом не обнаружено достоверного изменения процента CD34⁺ клеток при анализе суспензионных и МСК-ассоциированных ГСПК. Как на RPM, так и в статическом контроле наблюдалось формирование областей «булыжной мостовой», что свидетельствует о наличии наиболее ранних гемопоз-тических предшественников, которые *in vivo* способны давать очаги активного кроветворения. Количество мелких колоний снижалось в 1,6 раз на RPM, что может свидетельствовать о замедлении гемопоза. Для уточнения динамики амплификации ГСПК будет увеличено время экспозиции в условиях моделирования микрогравитации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-29-04026.

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА НА ТЕЧЕНИЕ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Елена Станиславовна Головнева¹, Жан Александрович Ревель-Муроз², Максим Валерьевич Сокол¹, Полина Андреевна Фортыхина², Александр Александрович Чесноков², Татьяна Геннадьевна Кравченко²

¹ «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

² ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск, Россия;

micron30@mail.ru

Актуальность. Для восстановления структуры и функции поджелудочной железы у животных с аллоксановым сахарным диабетом (СД) перспективна активация собственных стволовых клеток, которые могут не только менять нейроиммуноэндокринные взаимодействия в организме, но, при определенных условиях, дифференцироваться до инсулин-продуцирующих клеток. Значимым источником стволовых клеток является костный мозг. Наши предыдущие работы показали усиление миграции стволовых клеток в кровь под влиянием лазерного воздействия на костный мозг и возможности стимуляции репаративных процессов в миокарде и печени. Однако не изучалось влияние данного воздействия на течение аллоксанового СД.

Целью настоящей работы стало изучение влияния лазерного воздействия на костный мозг на уровень глюкозы крови и морфофункциональные характеристики поджелудочной железы при аллоксановом СД.

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на 48 крысах-самцах массой 200–250 г. Аллоксановый СД моделировали путем трехкратного внутривенного введения аллоксана в суммарной дозе 300 мг/кг массы тела животного. Использовали лазер ИРЭ «Полюс» (Россия) 970 нм, мощностью 0,5 Вт. Зоны локализации костного мозга (бедренные, тазовые кости, основание хвоста) облучали 1 раз в сутки, 5кратно. На сроках 1, 7, 14, 30 суток на после окончания введения аллоксана в плазме крови крыс определяли концентрацию глюкозы унифицированным глюкозооксидазным методом, затем животных выводили из эксперимента. После стандартной гистологической подготовки готовили парафиновые срезы поджелудочной железы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическим методом выявляли инсулин-позитивные клетки и клетки, несущие рецептор CD117⁺. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием метода Манна-Уитни.

Результаты. В группе лазерного воздействия на костный мозг наблюдалось достоверное снижение уровня гликемии по сравнению с контролем, начиная с 7 суток эксперимента. При морфометрическом исследовании препаратов животных с лазерным воздействием на костный мозг отмечалось увеличение относительной площади, занимаемой островками в паренхиме поджелудочной железы, удельной доли β -клеток в островках, появление инсулин-позитивных клеток в рыхлой соединительной ткани железы, увеличение содержания CD117⁺ клеток. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии лазерного воздействия на костный мозг на течение аллоксанового СД и стимуляцию репарации островкового аппарата поджелудочной железы.

ВЛИЯНИЕ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ, ЭРИТРОПОЭТИНА И ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Полина Александровна Голубинская^{1,2}, Марина Владиславовна Сарычева², Сергей Викторович Надеждин², Юрий Евгеньевич Бурда^{1,2}

¹ ООО «Центр клеточных технологий Бирюч», с. Малобыхово, Россия;

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

polinapigeon@gmail.com

Возможность модуляции функциональной активности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) эритропоэтином (EPO), вальпроевой кислотой (VPA) и дексаметазоном (DEX) ещё не реализована в мире. Есть данные, что EPO повышает выживаемость МСК при их совместном введении, EPO снижает воспалительное микроокружение язв диабетической стопы. Показано, что лечение с применением VPA ингибирует пролиферацию, дифференцировку МСК, влияет на гемопоэтические клетки-предшественники. Установлены индуктивные свойства DEX в плане усиления противовоспалительной активности эмбриональных фибробластов. В качестве исследуемых цитокинов выбраны провоспалительные цитокины: IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-23, IL-9; противовоспалительные цитокины: IL-10, IL-27; внутрисистемные иммунные регуляторы: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-21; цитокины с внеиммунными эффектами: IL-22, GM-CSF.

Цель. Установить изменения функциональной активности МСК из жировой ткани *in vitro* после обработки VPA, EPO, DEX.

Материалы и методы. МСК были выделены из жира 6 доноров с использованием коллагеназы. МСК рассеивали в 2 планшета, обрабатывали 1 МЕ/мл EPO, 20 мкг/мл VPA или 10 мкмоль/мл DEX. Инкубировали 3 ч, отмывали, культивировали в стандартных условиях 72 ч. Мононуклеары из крови доноров выделяли в градиенте плотности фикола, добавляли в планшеты с МСК, туда же добавляли фитогемагглютинин 10 мкг/мл, липополисахарид 100 нг/мл. Через 24, 48 ч отбирали из лунок супернатант для исследования цитокинов. Концентрации цитокинов определяли на мультитеплексном анализаторе MAGPIX. Статистическая обработка результатов проведена в программе xPonent 4.2.

Результаты. МСК, стимулированные DEX, достоверно снижают продукцию цитокина, активирующего цитотоксический Т-клеточный ответ, — IFN- γ . Также эти клетки показали тенденцию к подавлению продукции IL-4 и IL-5, играющих важную роль в развитии IgE-опосредованных аллергических реакций. В отдельных случаях нативные и обработанные EPO/VPA МСК жировой ткани вызывали резкое усиление или незначительное снижение продукции IL-22, GM-CSF. Учитывая роль IL-22 в стимуляции защитных и регенеративных процессов в слизистых оболочках, а GM-CSF в миелоидном гемопоэзе, целесообразно увеличение исследуемой группы и вариация доз препаратов. Таким образом, использование EPO, VPA интересно в отношении стимуляции защитных свойств слизистых оболочек. Продукция регуляторных цитокинов IFN γ и IL-2 снижалась под влиянием стимулированных DEX МСК, что говорит о возможном подавлении иммунного ответа.

СРАВНЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОРОВ *IN VITRO*

Полина Александровна Голубинская^{1,2}, Марина Владиславовна Сарычева², Сергей Викторович Надеждин², Юрий Евгеньевич Бурда^{1,2}

¹ ООО «Центр клеточных технологий Бирюч», с. Малобыково, Россия;

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

polinapigeon@gmail.com

Иммунокорректирующая активность мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани коров (МСК), индуцированных дексаметазоном (DEX), может быть использована при разработке препарата для иммунопрофилактики инфекционной заболеваемости животных. По сравнению с клетками из других органов, МСК жировой ткани легче выделять и культивировать для получения биологически активных факторов, которые могут быть применены в терапии различных заболеваний животных.

Цель. Оценить влияние секрета коровьих МСК обработанных DEX на продукцию ИЛ-1 β и ИЛ-10 мононуклеарами периферической крови (МПК).

Материалы и методы. МСК выделяли с помощью 0,075% раствора коллагеназы 2 типа. Для получения секрета клетки обрабатывались DEX, затем культивировались 3 суток на бессывороточной среде. После этого клетки замораживали вместе с секретом без криопротектора. После оттаивания формировался клеточный лизат с секретом. В связи с отсутствием тест-систем для КРС для оценки иммуноотропного влияния секрета использовали мононуклеары периферической крови (МПК) человека. МПК сеяли в 96-луночные планшеты по 200 тыс. клеток на лунку с добавлением исследуемого секрета МСК. Для стимуляции продукции цитокинов к МПК добавляли липополисахарид 100 нг/мл. Планшет инкубировали 24 ч в стандартных условиях, затем центрифугировали и отбирали супернатант для исследования концентрации цитокинов. Определение уровня ИЛ-1 β и ИЛ-10 проведено с помощью наборов для ИФА (Вектор-БЕСТ, Россия).

Результаты. Клеточный лизат с секретом коровьих МСК, обработанных DEX, усиливал ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов человеческими МПК: выработка ИЛ-1 β стимулировалась в 3,52 раза, выработка ИЛ-10 — в 1,91 раз. При этом без ЛПС он не стимулировал продукцию цитокинов. Таким образом, выявлен потенцирующий эффект лизата и секрета коровьих МСК на человеческие МПК. Данный эффект требует дальнейшего изучения.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЗА РАМКАМИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Полина Александровна Голубинская¹, Андрей Николаевич Рябчинский¹, Сергей Викторович Надеждин², Максим Викторович Пузанов¹, Юрий Евгеньевич Бурда^{1,2}

¹ Центр клеточных технологий Бирюч, с. Малобыково, Россия;

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

yu.burda@brc.efko.ru

Понимание как большинства биологов и медиков, так и внепрофессиональной аудитории словосочетания «клеточные технологии» постепенно меняется. Если раньше оно было четко связано со стволовыми клетками и регенеративной медициной (362 млн запросов по “stem cell” против 134 млн по “cell therapy” в Google на 12.09.2018), то теперь оно сдвигается в сторону клеточной терапии, как более широкого поля (269 млн запросов по “stem cell” против 266 млн по “cell therapy” в Google на 09.08.2019). И это совершенно закономерно, т.к. активно развиваются многие направления клеточных технологий, которые находятся за рамками использования стволовых клеток и представляют не меньший интерес.

Можно четко выделить несколько направлений, достойных более подробного освещения.

Применение аутологических и аллогенных иммунокомпетентных клеток с противоопухолевой (цитотоксические лимфоциты, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки и их сочетания) или с иммуносупрессивной (Treg) целью.

Применение клеток-артефактов, отсутствующих в нормальном организме, полученных *in vitro* и обладающих узкоспециализированными функциями. Это лимфокин-активированные киллерные (LAK) клетки, Т-лимфоциты с химерным рецептором (CAR), используемые в иммунотерапии онкозаболеваний, генно-модифицированные клетки для коррекции наследственных заболеваний.

Применение стромальных клеток с противовоспалительной и иммунокорректирующей целью. Например, FDA зарегистрирован препарат аллогенных мезенхимальных стволовых клеток “Prochymal” (Osiris Therapeutics Inc.), предназначенный для лечения РТПХ и болезни Крона и проходящий клинические исследования по ряду других показаний. Хотя большой эффективности этот препарат не показал, само направление остается перспективным благодаря свойствам стромальных клеток.

Разработка лекарственных средств, на основе продуцируемых клеточными культурами комплексов биологически активных веществ, в том числе в составе микровезикул и экзосом.

Использование клеточных линий и iPS-клеток для изучения механизма развития врожденных генетических дефектов, подходов к их антенатальной диагностике, профилактике и лечению.

Использование клеточных линий в качестве замены лабораторным животным в доклинических исследованиях лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения, в тестировании косметических средств на токсичность.

Хотя и не прямо, но многие из указанных направлений связаны с регенеративной медициной в рамках естественного течения патологических процессов.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Марина Олеговна Гомзикова, Севиндж Камаловна Клетухина, Ольга Андреевна Неустроева, Сирина Василевна Курбангалеева, Альберт Анатольевич Ризванов

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

marina.gomzikova.gmo@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) проявляют иммуносупрессивное действие, подавляя пролиферацию Т- и В-клеток, модулируя созревание и активацию регуляторных Т-клеток, ингибируя секрецию провоспалительных цитокинов. Терапевтический потенциал аллогенных МСК исследуется при воспалительных заболеваниях, аутоиммунных заболеваниях и отторжения трансплантата (<http://clinicaltrials.gov/>). Однако применение СК в клинике ограничено вследствие высокой стоимости приготовления клеточного препарата, риска неограниченной пролиферации клеток, а также невозможности хранения препарата.

Внеклеточные везикулы (ВВ) — перспективный инструмент бесклеточной терапии. ВВ сохраняют биологическую активность и иммунологические свойства родительских СК, не несут риска формирования опухолей, процедура получения промышленно адаптируема, возможно сохранить препарат ВВ. Однако развитие терапевтических подходов на основе ВВ ограничивает небольшой выход продукта. Известен способ получения индуцированных мембранных везикул в повышенном количестве с использованием цитохалазина В. Мембранные везикулы индуцированные цитохалазином В (МВ-ЦВ) представляют собой безъядерные везикулы, окруженные мембраной и содержащие цитоплазматическое содержимое родительских клеток. Ранее МВ-ЦВ были получены из клеток HEK293, 3T3 фибробластов, HUVEC, MDCKII-MDR1, SH-SY5Y и PC3. Однако до настоящего времени иммунологические свойства МВ-ЦВ, полученных из МСК, исследованы не были.

В данной работе впервые нами были охарактеризованы МВ-ЦВ из МСК. Был оценен иммунный ответ и активация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) после обработки МВ-ЦВ МСК.

Для оценки влияния МВ-ЦВ на активацию лимфоцитов, МКПК, предварительно окрашенные CFDA SE, инкубировали с МВ-ЦВ МСК в течение 24 часов, а затем обрабатывали 10 мкг/мл ФГА. Как и ожидалось, ФГА значительно индуцировал пролиферацию МКПК ($43,1 \pm 5,9\%$ пролиферирующих МКПК). Обнаружено, что МВ-ЦВ МСК ингибировали активированную ФГА пролиферацию МКПК ($15,35 \pm 0,6\%$ пролиферирующих МКПК).

Затем мы проанализировали влияние МВ-ЦВ на ФГА-активированную пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+CD8^+$), Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и В-клеток ($CD45^+CD3^-CD19^+$). Мы обнаружили, что предварительная обработка МВ-ЦВ МСК приводит к ингибированию ФГА-активированной пролиферации $CD4^+$, $CD19^+$, $CD8^+$ клеток в 2,9, 2,1 и 2,9 раза соответственно.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-75-00090.

РАЗЛИЧИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОВРЕЖДЁННОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ОБЩЕЙ РНК ЭТИХ КЛЕТОК

Залина Залимгериевна Гоникова, Алла Олеговна Никольская, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Мурат Юнусович Шагидулин, Нина Андреевна Онищенко, Виктор Иванович Севастьянов

ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. Н.И. Шумакова», Москва, Россия

zalina3392@gmail.com

Высокий регенерационный потенциал клеток костного мозга (ККМ) связывают с присущей им способностью к быстрой адаптивной перестройке работы генома, которая осуществляется с участием многочисленных регуляторных белок-некодирующих РНК и, прежде всего, микроРНК. Между тем, РНК в ККМ, как и в других клетках организма, представляет собой систему сигнальных молекул различных классов белок-некодирующих РНК, регуляторный эффект которых достигается их взаимодействием, в том числе с молекулами белок-кодирующих РНК.

Цель исследования: установить особенности регуляции восстановительных процессов в повреждённой печени при традиционном использовании мононуклеарных ККМ и общей РНК (оРНК), выделенной из этих ККМ в эффективных дозах.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar, у которых моделировали повреждение печени либо путём резекции (70% гепатэктомия) — 1 серия (n=75), либо путём хронического токсического воздействия CCl_4 в комбинации с неполным адьювантом Фрейнда — 2 серия опытов (n=100). Каждая серия включала 3 группы экспериментов: контроль (введение физиологического раствора), введение ККМ ($30-35 \times 10^6$ клеток) или оРНК из ККМ (30 мкг/100 г веса животного). Во всех группах животных контролировали летальность, а также динамику митотической и пролиферативной активности гепатоцитов до 14 суток и восстановление массы печени в течение 1 месяца в 1 серии и динамику восстановления биохимических и гистологических показателей (контроль дефиброзирующих процессов) печени в течение 6 месяцев во 2 серии.

Результаты. В 1 серии во всех группах отмечено повышение митотической и пролиферативной активности гепатоцитов и восстановление массы печени до исходного уровня, но более заметно и быстро эти показатели восстанавливались при использовании оРНК. Во 2 серии ускорение нормализации функциональных (биохимических) показателей печени в группах с использованием ККМ и оРНК не сопровождалось одновременным восстановлением исходного морфологического состояния печени, однако в группе с оРНК процессы дефиброзирования ткани печени начинались раньше.

Заключение. оРНК из ККМ эффективнее по сравнению с самими ККМ стимулируют восстановительные процессы в печени как при остром, так и хроническом токсическом повреждении.

ПРИМЕНЕНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Андрей Евгеньевич Гончаров^{1,2},
Александр Викторович Прохоров³,
Оксана Васильевна Тимохина^{1,2}

¹ Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь;

² Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь;

³ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

andrei.hancharou@gmail.com

Рак поджелудочной железы (РПЖ) представляет серьёзную проблему для медицины в связи с высокой заболеваемостью и крайне неблагоприятным прогнозом для жизни. В этой связи, требуется разработка нового метода терапии этого фатального заболевания, позволяющая, если не вылечить пациента, то, по крайней мере, существенно увеличить продолжительность жизни.

Целью настоящего исследования было оценить безопасность, переносимость и эффективность применения дендритных клеток (ДК) в лечении РПЖ.

В исследовании, проведенном с января 2017 г. по май 2019 г. на базе Минского городского онкодиспансера, приняли участие 26 пациентов с диагнозом РПЖ. Всего подготовлено и выполнено подкожное введение аутологичных ДК, праймированных лизатом опухоли и короткоцепочечными пептидами белков MСU-1 и WT-1, для 26 пациентов, из них 1 курс терапии ДК (5 инъекций) получили 11 пациентов, 2 курса — 6 пациентов, 3 курса — 8 пациентов.

Переносимость и безопасность применения способа клеточной терапии оценены как хорошие — постинъекционные реакции или побочные явления отсутствовали. После лечения ДК зарегистрировано достоверное снижение содержания Т-регуляторных клеток ($p=0,003$), что указывает на активацию системы иммунитета. Установлено, что у 80,8% пациентов с РПЖ выявлено увеличение содержания антигенспецифических Т-клеток (АСК). Содержание ЦОК достоверно снижалось после лечения ДК у 91% пациентов и составляло не выше 0,5 кл./мл, что является благоприятным прогностическим признаком.

Из 26 пациентов на момент подготовки тезисов живы 20. Летальный исход наступил у 6 пациенток, из них у 2 пациентов на момент начала лечения ДК была установлена 4 клиническая стадия, а у 4 пациентов — стадия 2В. В то же время, все пациенты, которым выполнено 3 курса ДК ($n=8$) и большая часть пациентов, которым выполнено 2 курса ДК ($n=5$) живы, без признаков прогрессирования болезни.

Результаты исследования показали, что дополнительное проведение клеточной терапии ДК на фоне стандартного лечения РПЖ в адьювантном режиме, позволяет достоверно увеличить годовую выживаемость на 44,4% (без иммунотерапии 33,8% (ретроспективная контрольная группа, $n=152$), с иммунотерапией 78,2%), при этом годовая безрецидивная выживаемость после радикального лечения ($n=20$) составила 90%. Можно сделать предварительный вывод о том, что начало лечения на стадиях, не превышающих 2А и проведение 3 курсов ДК ассоциировано с благоприятным исходом заболевания.

BNIP3 КАК РЕГУЛЯТОР МИТОФАГИИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

Анна Сергеевна Горбунова¹, Татьяна Викторовна Денисенко¹, Борис Давидович Животовский^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

gorbunovaanna94@gmail.com

Рак лёгкого занимает лидирующую позицию среди онкологической смертности в мире. По гистологическому анализу более 80% больных этим заболеванием относятся к группе носителей немелкоклеточного рака легких. Из них — у около 40% диагностирована аденокарцинома легкого (АКЛ). АКЛ характеризуется высокой степенью инвазии окружающих тканей и формированием метастаз. Фундаментальной задачей современной медицины является выявление механизмов малигнизации и диссеминации раковых клеток.

BNIP3 — белок семейства Bcl-2 участвует в регуляции митофагии и других видов клеточной гибели. Кроме того, на примере других типов рака, было показано, что BNIP3 принимает участие в регуляции процессов метастазирования. В связи с этим целью нашей работы стало изучение потенциальной роли BNIP3 в регуляции механизмов метастазирования АКЛ, а также анализ взаимосвязи между регуляцией метастазирования и митофагией.

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — сложный процесс приобретения эпителиальными клетками мезенхимальных свойств, играющий важную роль в формировании метастазов. Для выяснения роли BNIP3 в регуляции ЭМП была оценена экспрессия транскрипционных факторов ЭМП Snail и Twist, в клетках линий АКЛ A549 дикого и нокаутных по белку BNIP3 (ссBNIP3) типа. Вестерн-блот анализ выявил увеличение уровня данных белков в клетках линии ссBNIP3. Полученные данные согласуются со снижением уровня белка межклеточных контактов E-cadherin и увеличением уровня мезенхимального маркера Vimentin в линии ссBNIP3, что может свидетельствовать о негативной регуляции BNIP3 в процессе ЭМП.

Согласно данным литературы, процессы дробления и слияния, а также система контроля качества митохондрий — митофагия, влияющая на канцерогенез и метастазирование. BNIP3, регулируя митофагию, потенциально способен модулировать ЭМП. Для митофагии характерно дробление митохондрий, участником которого является белок Drp1. Нами показано, что подавление экспрессии BNIP3 в клетках A549 приводит к падению уровня фосфорилированной формы белка Drp1, а также к повышению уровня митохондриальных активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, участвуют в регуляции молекулярных механизмов ЭМП.

Таким образом, регулируя митофагию, BNIP3 также может воздействовать на процесс ЭМП в клетках АКЛ; подавление экспрессии BNIP3 в клетках АКЛ ассоциировано с активацией ЭМП, снижением дробления митохондрий и повышением уровня АФК. Полученные данные доказывают, что BNIP3 играет важную роль в регуляции процессов метастазирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛАСТИКА УРЕТРЫ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

Анна Андреевна Горелова^{1,3}, Александр Николаевич Муравьев^{1,4}, Наталия Михайловна Юдинцева², Юлия Александровна Нащёкина², Татьяна Ивановна Виноградова², Андрей Игоревич Горелов³, Пётр Казимирович Яблонский^{1,3}

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Центр клеточных технологий, ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ Кафедра госпитальной хирургии, Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Кафедра хирургических болезней, Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

gorelova_a@yahoo.com

Введение. В настоящее время не существует абсолютного способа восстановления проходимости уретры. Наиболее часто в качестве материала для заместительной уретропластики у пациентов с протяженными стриктурами уретры применяют слизистую щęki. Однако, такая методика имеет ряд недостатков, таких как осложнения в донорской зоне, ограниченность источника ткани и увеличение продолжительности и инвазивности хирургического вмешательства. В 2017 году Европейская ассоциация урологов опубликовала систематический обзор и метаанализ доклинических и клинических исследований, который показал, что клеточные тканеинженерные конструкции (ТИК) значительно увеличивают положительный результат лечения (Versteegden L.R.M. et al., 2017). Однако, использование ТИК в качестве материала для уретропластики не вошло в рутинную клиническую практику и требует дальнейшего изучения. Имеющийся у нас опыт разработки и применения ТИК на основе биополимеров, заселенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) в экспериментах на животных показал их высокую биосовместимость и возможность использования для замещения дефектов мочевого пузыря и уретры (N.M. Yudincheva et al., 2016; N.M. Yudincheva et al., 2019).

Материал и методы. Исследование выполнено на 9 взрослых кроликах-самцах породы «шиншилла». Экспериментальной группе № 1 и № 2 в модели острой травмы ТИК, состоящие из слоев полилактида и поликапролактона (PL-PC), заселенных МСК и клетками буккального эпителия (КБЭ) соответственно. Группе № 3 выполнена трансплантация буккального лоскута. Сравнение проводили с интактными животными. Результаты оценивались через 12 недель лучевым и морфологическим методами, определяли жизнеспособность трансплантата и его интеграцию с нативной тканью.

Результаты исследования. В течение 12 недель происходит биодеградация скаффолдов (группа № 1 и № 3). В группе № 1 и № 3 наблюдалось меньшее фиброзирование окружающей ткани и меньшая инфильтрация клетками воспаления. Меченые наночастицами МСК и клетки КБЭ выявлялись в уретелии и подлежащем мышечном слое.

Вывод. Наши результаты показывают, что скаффолд на основе PL-PC, засеянный МСК или КБЭ, может быть использован для дальнейших клинических исследований.

ДВОЙНАЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ И ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СФЕРОИДОВ ИЗ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Анастасия Алексеевна Горкун¹⁻³, Дарья Петровна Ревокатова⁴, Ирина Михайловна Зурина¹⁻³, Настасья Владимировна Кошелева^{1,3,4}, Лариса Николаевна Скуратовская¹, Ирина Николаевна Сабурова^{1,3}

¹ ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;

² Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

stgork@gmail.com

Проблема получения *in vitro* искусственной костной ткани с надлежащей васкуляризацией по-прежнему остается одним из наиболее актуальных вопросов регенеративной медицины. В настоящее время для стимуляции остеогенеза используют сокультивирование остеобластов с эндотелиальными клетками. Однако данный подход не отражает динамического взаимодействия ангиогенеза и остеогенеза, характерного для эмбрионального развития, и не приводит к формированию полноценной васкуляризованной ткани. Поэтому целью данного исследования стал анализ развития двойной (остеогенной и эндотелиальной) клеточной дифференцировки в сфероиде из стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) при одновременной индукции.

СКЖТ, выделенные из жировой стромально-сосудистой фракции липоаспирата, культивировали в стандартных условиях инкубации (+37 °C, 5% CO₂). Сфероиды получали в агарозных планшетах (Microtissue, США). Экспериментальные группы включали: 1 — интактные сфероиды (контроль); 2 — остеогенная индукция; 3 — эндотелиальная индукция; 4 — двойная индукция. Сфероиды были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии, иммуноцитохимического окрашивания и ПЦР в реальном времени на 1, 7, 14 и 21 день 3D культивирования.

Полученные сфероиды имели одинаковую морфологию с разделением на поверхностную и центральную зоны в течение всего периода культивирования. Был показан синтез раннего остеогенного маркера OstP и эндотелиального маркера Flk-1 на 7 сут. во всех экспериментальных группах, включая контрольную группу. Максимальный уровень синтеза OstP и Flk-1 был показан для групп с эндотелиальной и двойной дифференцировкой на 7 и 14 сут. Однако значительное повышение экспрессии ключевого гена раннего остеогенеза Osterix было показано только при индукции двойной дифференцировки.

Таким образом, настоящее исследование показало, что в неадгезивной культуре СКЖТ способны к самопроизвольному остеогенезу и ангиогенезу. Однако, наиболее быстрый и масштабный эффект, с вовлечением большего числа клеток в процесс обеих дифференцировок, был показан именно для двойной индукции, что свидетельствует о необходимости совмещения ангиогенеза и остеогенеза. Эти результаты открывают

новые подходы к созданию васкуляризованных биоэквивалентов *in vitro*.

Исследование было поддержано фондом Грант Президента Российской Федерации (грант МК-3776.2019.4).

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 18-15-00407).

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ РЕЦЕПТОРОВ/ЛИГАНДОВ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ *IN VITRO* ГИПОКСИИ

**Александра Николаевна Горностаева,
Елена Ромуальдовна Андреева,
Людмила Борисовна Буравкова**

Лаборатория клеточной физиологии, ГНЦ
РФ Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

HindIII@yandex.ru

Способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) модулировать иммунный ответ открывает широкие возможности для их использования в регенеративной медицине и биотехнологии. Особый интерес представляет влияние МСК на Т-клетки — основное звено адаптивного иммунитета. Большая часть данных относительно контактов МСК–Т-клетки получена в экспериментах при стандартном уровне O_2 (20%). При этом хорошо известно, что концентрация O_2 в тканях, где происходит взаимодействие МСК с клетками иммунной системы, гораздо ниже (1–5%). Согласно данным нашей лаборатории, при 5% O_2 МСК оказывали более выраженный антипролиферативный эффект в отношении Т-клеток, причем для этого был необходим прямой контакт. Возможно, в гипоксии более эффективно функционирует механизм иммуносупрессии, реализуемый через контактное взаимодействие. Известен ряд рецепторов/лигандов, вовлеченных в иммуносупрессию и подверженных влиянию гипоксия-зависимого транскрипционного фактора HIF: TLR, галектины, PDL, HLA-G. Мы проанализировали изменение экспрессии этих молекул на поверхности МСК после взаимодействия с Т-клетками методом проточной цитометрии при 20% и 5% O_2 .

В исследованиях использовали МСК жировой ткани человека и Т-клетки, выделенные методом магнитной сепарации из МНК периферической крови человека. Сокультивирование длилось 72 часа при 20 и 5% O_2 в модели контактного взаимодействия.

МСК эффективно подавляли активацию Т-клеток, выявляемую с помощью позднего маркера HLA-DR, и обладали выраженным антипролиферативным эффектом. При 5% O_2 снижение доли делящихся Т-клеток было в два раза более выраженным.

Поверхностные рецепторы/лиганды на МСК в монокультуре были одинаково представлены независимо от концентрации O_2 . После взаимодействия с Т-клетками экспрессия PD1, PD2, галектина 1 и 3 на поверхности МСК существенно возрастала. В случае галектина 1 и 3 при 5% O_2 этот эффект был более выражен. Кроме того, после взаимодействия возрастала экспрессия TLR4, но только при 5% O_2 .

Влияние галектинов и TLR-4 на иммуносупрессивные свойства МСК при пониженном содержании кислорода не исследовано. Дальнейшее изучение поможет определить вклад этих молекул в реализацию

иммуносупрессивных свойств МСК при тканевых уровнях O_2 . Эти данные могут быть востребованы для разработки протоколов применения МСК в регенеративной медицине и трансплантологии, с целью для повышения эффективности подавления нежелательного иммунного ответа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-015-00461 А.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОРИЕНТАЦИОННАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ БИОМИМЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОРИСТЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ КОРРЕЛЯЦИОННО-СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И МАТЕМАТИЧЕСКОГО АППАРАТА ТЕОРИИ МОРФИЗМОВ И (ИЛИ) ТЕОРИИ КАТЕГОРИЙ

**Владимир Николаевич Горшенёв¹,
Олег Валерьевич Градов², Маргарита
Алексеевна Градова²**

¹ ФГБУН Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), Москва,
Россия;

² ФГБУН Федеральный исследовательский центр
химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (ФИЦ
ХФ РАН), Москва, Россия

o.v.gradov@gmail.com

Известно, что кальций-фосфатные соединения и композиты с природными и синтетическими полимерами являются превалирующими компонентами для создания биомиметических костных имплантатов клинического назначения с активными свойствами: кальций-фосфатные соединения индуцируют многие реакции, аналогичные протекающим в процессе остеогенеза. Развиваемые в работе коллектива (PMID: 28617405 / 24757850) подходы к биомиметической остеорегенерации (замещающей структурную биоминерализацию) связаны с использованием механо-акустического и ультразвукового диспергирования, а также реакций по синтезу кальций-фосфатных соединений непосредственно в полимерных суспензиях для построения биомиметических пористых тканеинженерных конструкций с оптимальной микроструктурой. Для выбора оптимальных условий синтеза и контроля необходимы данные исследований методами, обеспечивающими сопоставление с биологическими структурами. Для характеристики гидроксиапатитных матриц медицинского назначения применяются волюметрические (PMID: 22733619), гранулометрические (PMID: 21942921), гистометрические (PMID: 22324006) критерии; то есть предмет изменения должны быть как свойства матрицы, так и свойства прекурсора, а также свойства формирующихся на ней ткани. В связи с этим, ЦКП мультипараметрической микроскопии (с. н. с. О.В. Градов) внедрены (в том числе — в реальном времени) следующие методы оценивания продуктов биоминерализации и биомиметиков: оценивание по интегральным частотным характеристикам и интегральным пространственным характеристикам (как в DOI: 10.26641/1997-9665.2018.2.7-21) данных низковольтной сканирующей электронной микроскопии (в том числе — *in situ*, что перспективно для ESEM-техник); установление корреляции указанных характеристик в режиме блинк-компаратора (с постоянной времени от 0.44 сек.) для разных композитов или

референсной биологической структуры и композита — для сопоставления их в рамках теории с применением теории морфизмов — вплоть до изоморфизма для идентичных структур. В качестве опорного программного продукта был принят QAVIS (на базе FFTW-библиотеки для режима реального времени), а также KSAImage (для подробного пост-анализа) — разработки ТОИ ДВО РАН (лаб. 8/1; В.К. Фищенко, А.А. Гончарова). Было доказано, что динамические интегральные частотные и интегральные пространственные характеристики у различных по биоподобию композитов (в т.ч. с желатиной и коллагеном как моделью матрикса (PMID: 24982861, 19637997, 31226642) различны, как и 2D Фурье-спектры их структур.

ЭМЕРДЖЕНТНЫЙ ТОПОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИНТЕГРАЦИИ СВОЙСТВ ТВЕРДОТЕЛЬНЫХ И ЧАСТИЧНО-УПОРЯДОЧЕННЫХ СРЕД В ПОРИСТЫХ СКАФФОЛДАХ И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ: АНАЛИЗ НА ПРИМЕРЕ ГИДРОКСИАПАТИТА И ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА С МНОГООСНОЙ CLSEM-ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

Владимир Николаевич Горшенёв¹, Анатолий Александрович Ольхов^{1,2}, Олег Валерьевич Градов³, Маргарита Алексеевна Градова³, Павел Леонидович Александров⁴

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), Москва, Россия;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия;

³ ФНБУН Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (ФИЦ ХФ РАН), Москва, Россия;

⁴ ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

o.v.gradov@gmail.com

Внедрение в остеорегенерационную практику имплантатов и тканеинженерных конструкций на основе кальций-фосфатных соединений в полимерной матрице (или соответствующих покрытий) часто сталкивается с проблемой неэквивалентности свойств композитов, получаемых по близким, с позиций материаловедения, «рецептурам». Подходы механики композитов, использующие усреднение (исключая методы механики структурированной и (или) гетерогенной среды), дают существенную невязку при аппроксимации таких экспериментальных данных. Полный пул дескрипторов модели усложняет её, но также не влечёт аппроксимативной сходимости, поскольку невозможно её достигнуть для всех неидентичных кривых одновременно. Примером данных невязок является разброс характеристик композиций «полигидроксибутират-гидроксиапатит», получаемых с 1980-х гг. (PMID:1764555) до сего времени (DOI:10.1016/j.jmst.2016.07.007).

Нами был предпринят многоугольной электронно-микроскопический анализ с построением псевдотрёхмерных моделей (что близко к понятию электронной томографии или, при отличном позиционировании, электронной голографии) образцов полигидроксибутирата

и гидроксиапатита, полученного различными методами. После этого была осуществлена попытка сборки одно-масштабных изображений, в результате которой было выяснено, что интеграция моделей с несогласованием параметров пористости гидроксиапатита и условного титра-сечения нетканого волокна полигидроксибутирата, полученного технологией электроформования, невозможна, а также выявлено наличие топологических ограничений на заполнение пористой тканеинженерной матрицы полимером, аналогичное работающему в случае заполнения пористой матрицы клетками. При многоосной лазерной микроскопии, используемой для мофо-топологической идентификации структур в гисто- и морфогенезе (DOI:10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967) эти критерии, в частности, индицируются как топологическая связность пространства ткани и (или) гистогенеза (описание на русском: <http://jre.cplire.ru/jre/jan12/6/text.html>). При внедрении топологических критериев в квалитетрию микропористых матриц и (или) тканеинженерных конструкций возникает возможность предсказать рост и развитие ткани и биодеградацию и (или) биорезорбцию полимера одновременно, в корреляции с методами получения и соотношением содержания полимерной и неорганической составляющих композита. Невозможность конфигураций с запрещенными топологиями отсеивает неэффективные методы синтеза и ряд соотношений фаз, определяющих геометрию скаффолда и морфогенез ткани в нём.

МНОГУГЛОВАЯ ЛАЗЕРНАЯ И ЭЛЕКТРОННО-ПУЧКОВАЯ ПОРОЗИМЕТРИЯ СКАФФОЛДОВ, ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ МАТРИКСОВ И ТКАНЕПОДОБНЫХ МОДЕЛЕЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ — В ESEM- И CLSEM-ИМПЛЕМЕНТАЦИИ

Олег Валерьевич Градов

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

o.v.gradov@gmail.com

Общеизвестно, что пористость скаффолдов является одной из стратегических характеристик, определяющих эффективность их как клеточных матриц для целей регенеративной медицины (PMID: 31324062; PMID: 31235704; PMID: 24325858; PMID: 21599540). Всё чаще используемая в европейских условиях для этих целей компьютерная микротомография (PMID: 22139756) пока не является общераспространенной техникой, а разрешающая способность большинства доступных приборов оставляет желать лучшего, не допуская реализации многомасштабного анализа формы и размеров пор. Поэтому для определения пористости скаффолдов используются устаревшие методы аддитивного характера — такие, например, как жидкостная экструзионная порозиметрия (LEP — liquid extrusion porosimetry), не допускающая исследования морфометрических параметров отдельных пор и их ориентации. В силу и для преодоления указанного ограничения, её часто используют совместно со сканирующей электронной микроскопией, позволяющей собрать достаточную морфометрию для репрезентативной выборки ROI (PMID: 24907768). Однако при электронной микроскопии мы можем видеть внешние контуры сложных пор, но не можем оценить их внутренние эквивалентные диаметры или объём и глубину. Между тем, именно эти параметры детерминируют рост клеток в скаффолдах (PMID: 24039979), хотя даже

в позиционирующей этот факт цитируемой работе, озаглавленной "Geometry-driven cell organization determines tissue growths in scaffold pores", используются двумерные репрезентации. С физико-химических позиций, для большинства релевантных материалов объемная геометрия пор однозначно связана с ролью их в набухании (PMID: 21669444) и, как следствие, «физико-механической» биосовместимости чего нельзя сказать о каком-либо одиночном двумерном сечении. Поэтому необходим метод, который позволял бы одновременно визуализировать и морфометрировать одиночные поры скаффолдов и других пористых структур регенеративной медицины (особо — децеллюляризованных матриц и 3D-принтируемых тканеподобных моделей), анализировать их анизотропию / пространственную ориентацию и измерять их в объеме, в том числе — в естественных условиях (при набухании и росте числа клеток в них). Нами разработан метод, базирующийся на совмещении многоугольных техник лазерного имэджинга и электронной микроскопии (CLEM) в камере контролируемой атмосферы (ESEM) и получении двумерных Фурье-спектров и интегральных пространственных характеристик, а также — серий спектрозональных изофот изоопак для отличных лазерных источников.

ЭТИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРОГНОЗА: НОВЫЕ ВЫЗОВЫ И ПРОБЛЕМЫ

Елена Георгиевна Гребенщикова^{1,2}

¹ Центр научно-информационных исследований по науке, образованию и технологиям ИНИОН РАН, Москва, Россия;

² Кафедра биоэтики РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

aika45@yandex.ru

Этические контексты медицинского прогноза долгое время базировались на принципах благодеяния и непричинения вреда, определяя как специфику информирования пациентов, в том числе в неблагоприятных случаях, так и рекомендации по взаимодействию с родственниками. Необходимость переосмысления и дополнения сложившихся моральных установок детерминирована прежде всего двумя обстоятельствами: расширением информированности и автономии пациентов, а также стремительным развитием новых методов диагностики, лечения и восстановления утраченного здоровья, которые в некоторых случаях тесно связаны со сферой биомедицинских исследований и экспериментов. Так, активное развитие генетического тестирования привело к формированию «ситуаций ожидания», обусловленных прогнозированием заболеваний, которые пока себя никак не проявили, выдвинув в центр этической рефлексии комплекс вопросов, требующих дальнейшего переосмысления идеи информирования в этой области. При этом речь идет как о медицинской генетике (т.е. специфике взаимодействия врача с пациентом), так и о потребительской генетике (т.е. самостоятельном тестировании, которое не всегда заканчивается обращением к специалисту). Специфика этических измерений новых направлений медицины, как например, регенеративной медицины, продиктована не только их клинической практикой, но и инновационным потенциалом. С биомедицинскими инновациями связаны значительные ожидания общества, которые влияют на формирование как новых «режимов нормативности», так и социального запроса на развитие того или иного направления

медицины. В свою очередь, информирование пациента о прогнозе в клинической практике регенеративной медицины, неизбежно ориентируясь на параметры вероятности и неопределенности, а также особенности заболевания, возраст, обстоятельства жизни индивида, предполагает учет новых вызовов и сохранение базовых установок биомедицинской этики — предосторожности, ответственности, необходимости сотрудничества — для успешного достижения общей цели. В рассматриваемом контексте важно также отметить значимость упомянутых моральных обязательств для практики информирования участников биомедицинских исследований.

Тезисы подготовлены при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 19-18-00422.

ТЕХНОЛОГИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Игорь Анатольевич Гривенников¹, Екатерина Вячеславовна Новосадова¹, Алла Викторовна Ставровская³, Елена Львовна Арсеньева¹, Станислав Анатольевич Антонов¹, Вера Вячеславовна Симонова³, Леонид Георгиевич Хаспеков³, Ольга Сергеевна Лебедева², Мария Андреевна Лагарькова², Николай Федорович Мосеедов¹, Вячеслав Залманович Тарантул¹, Сергей Николаевич Иллариошкин³

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия;

² ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия;

³ Научный центр неврологии, Москва, Россия

igorag@img.ras.ru

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека и их направленная дифференцировка создали новые перспективы в изучении молекулярных и клеточных основ тяжелых болезней человека и разработке подходов их клеточной терапии. Появились новые возможности для создания моделей нейродегенеративных патологий человека, а также тест-систем, позволяющих проводить *in vitro* масштабный скрининг лекарственных средств с нейропротекторными свойствами, направленных на лечение конкретных заболеваний с учетом индивидуальных особенностей пациента. В настоящей работе были получены и охарактеризованы культуры ИПСК из фибробластов с мутациями в генах *PARK8*, *PARK2* и *GBA*, полученных от пациентов с наследственными формами болезни Паркинсона (БП), и осуществлена направленная дифференцировка ИПСК в нейрональном направлении. В транскриптомах дофаминергических нейронов, дифференцированных из мутантных ИПСК, были обнаружены нарушения в экспрессии генов, связанных с клеточным метаболизмом, по сравнению с нейронами, дифференцированными из нормальных ИПСК. На основе полученных ИПСК создана многоуровневая тест-система для поиска и скрининга соединений с нейропротекторной активностью, представляющих фармакологический интерес, также позволяющая оценивать их цито- и эмбрио-нейротоксичность. Проанализированы соединения пептидной и непептидной природы на ИПСК, находящихся на начальных стадиях дифференцировки. На культурах нейрональных предшественников и терминально

дифференцированных нейронов продемонстрировано нейропротекторное действие ряда пептидов семейства меланокортинов, а также представителей семейства каннабиноидов, что указывает на перспективность использования ИПСК и их производных, дифференцированных в нейрональном направлении. Еще одной целью нашего исследования была разработка подходов к клеточной терапии БП с помощью ИПСК. После трансплантации ИПСК крысам с экспериментальной моделью паркинсонизма, индуцированного введением 6-гидроксидаофамина в черную субстанцию мозга крыс, в течение более 12 недель мы наблюдали отчетливое улучшение как двигательных, так и когнитивных функций, что создает принципиальную возможность коррекции нарушений моторики и когнитивных функций за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть ИПСК из соматических клеток пациентов.

Работа поддержана грантами Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» и РФФИ (№ 17-04-01661а).

ГЕТЕРОХРОМАТИЗАЦИЯ ПРИТЕЛОМЕРНОГО РАЙОНА ТРЕТЬЕЙ ХРОМОСОМЫ, СОДЕРЖАЩЕГО МАСШТАБНУЮ ДУПЛИКАЦИЮ, У ПАЦИЕНТА С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ

Мария Гридина¹, Сергей Ульянов², Полина Белокопытова¹, Вениамин Фишман¹, Игорь Лебедев³, Сергей Разин², Олег Серов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

³ НИИ медицинской генетики, Томск, Россия

gridinam@gmail.com

Прителомерный район короткого плеча третьей хромосомы содержит 3 гена, кодирующих молекулы адгезии нейрональных клеток: *CHL1*, *CNTN6* и *CNTN4*. Хромосомные перестройки в данном районе, как делеции, так и дупликации приводят к разнообразным нарушениям развития нервной системы, в том числе расстройствам аутистического спектра, умственной отсталости, синдрому дефицита внимания, нервной анорексии и синдрому Туретта. Ранее были описаны два пациента со схожими клиническими картинами и недифференцированной умственной отсталостью, у которых были выявлены микроделеция или микродупликация в районе 3p26.3, обе перестройки затрагивали единственный ген — *CNTN6*, кодирующий белок контактин-6 [Kashevarova et al., 2014]. Мы использовали технологию получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), чтобы иметь возможность после дифференцировки их *in vitro* анализировать целевую популяцию клеток, а именно кортикальные нейроны. В результате мы обнаружили, что экспрессия *CNTN6* была существенно снижена в нейронах как с одной, так и с тремя полноценными копиями этого гена. Данный факт может объяснять сходство симптомов, наблюдаемых у пациентов с делециями и дупликациями гена *CNTN6*. Более того, нами было показано, что в нейронах с тремя полноценными копиями гена *CNTN6* экспрессия шла хуже именно с дублированного аллеля.

Согласно нашим данным о трехмерной организации дублированного участка, нами были замечены намеки на его гетерохроматизацию. ChIP-seq анализ показал

в дублированном районе избыточное присутствие H3K9me3 (метки не активного хроматина) и заметное снижение H3K27ac и белка CTCF. Более того репрессивные метки распространялись существенно за пределы хромосомной перестройки.

Таким образом в клетках пациента с дубликацией, затрагивающей единственный белок-кодирующий ген *CNTN6*, нами обнаружена гетерохроматизация перестроенного района хромосомы. Важно отметить, что, хотя, хромосомная перестройка имеет размер 0,94 Mb, гетерохроматин распространяется на существенно больший участок, а именно около 7 Mb. Таким образом полученные данные позволяют заключить, что наблюдаемое снижение уровня экспрессии *CNTN6* на фоне наличия в геноме трех его полноценных копий, может быть связано с гетерохроматизацией района, включающего дупликацию.

Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта РАН № 0324-2019-0041 «Клеточные и молекулярно-генетические механизмы контроля адаптивных и патологических процессов у человека и животных».

ПОРИСТЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Тимофей Евгеньевич Григорьев¹, Кристина Георгиевна Антипова¹, Юрий Дмитриевич Загоскин¹, Ксения Игоревна Луканина¹, Елена Александровна Храмова², Сергей Владимирович Крашенинников¹, Сергей Николаевич Чвалун¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

timgrigo@yandex.ru

В настоящее время одной из наиболее динамично развивающихся и инвестиционно-привлекательных отраслей современной клинической медицины является регенеративная медицина. Среди широкого спектра исследований этой отрасли существенное место занимают высокотехнологичные биоискусственные системы, содержащие дифференцированные клеточные культуры; подобные тканеинженерные конструкции способны имитировать архитектуру нативного внеклеточного матрикса на субмикронном уровне, чем обеспечивают первоначальное пространство и условия для регенерации новых тканей. Объектом исследования клеточных регенеративных технологий является трехмерные биосовместимые (биоадекватные) носители — матриксы, обладающие заданной морфологией и регулируемые функциональными физико-химическими свойствами.

Основные требования, которые предъявляются к современным материалам для создания скаффолдов (каркаса будущих тканей) делятся на три основных направления. Первое — полная биологическая совместимость, т.е. отсутствие локального и масштабного токсического действия, отсутствие раздражающего и аллергического действия и кроме того устойчивость к стерилизации. Второе — объемная пористая структура, позволяющая обеспечить достаточную проницаемость для газов (кислорода, углекислоты) для обеспечения протекания репаративных процессов, кроме того поддерживающая миграцию, заселение и последующую пролиферацию клеток; способность к естественной резорбции с трансформацией в натуральный внеклеточный матрикс. Третье — приемлемые механические и физико-химические свойства, определяемые функциональной

принадлежностью замещаемого органа. Необходимо отметить, что различные клеточные культуры требуют особую пространственную структуру, имитирующую морфологию природного внеклеточного матрикса.

В докладе отражены основные подходы к созданию пористых материалов с настраиваемой структурой и свойствами: волокнистых нетканых, губчатых и гидрогелевых. Показано влияние структурных элементов матрикса на его физико-механическое поведение.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 17-03-01361.

ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПОРИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ БОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Тимофей Евгеньевич Григорьев¹, Юрий Дмитриевич Загоскин^{1,3}, Ксения Игоревна Луканина^{1,3}, Тимур Казбекович Токаев², Сергей Владимирович Крашенинников¹, Казбек Васильевич Токаев³, Виктор Иванович Севастьянов⁴, Сергей Николаевич Чвалун¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

timgrigo@yandex.ru

Полилактид — биосовместимый полимер, способный к биорезорбции. На основе этого полимера в настоящее время создаются различные изделия биомедицинского назначения: материалы для остеосинтеза, шовные материалы. Пористые биоинженерные конструкции представляют большой интерес вследствие возможности «настройки» механических свойств в широком диапазоне. Адекватность модуля упругости имплантируемого материала и прилегающих тканей — необходимое условие для исключения их контактного травмирования. Большая удельная поверхность при малом количестве полимерного материала позволяют замещать большие (до 1000 см³) объемы мягких тканей, не вызывая резкого повышения концентрации продуктов разложения в организме.

В рамках данной работы были получены губчатые материалы на основе поли-L-лактида и поликапролактона методом сублимационной сушки. Подобраны условия для бездефектной кристаллизации растворов полилактонов в 1,4-диоксане. Пористость изделий варьировалась в диапазоне 96–98%. Были проведены исследования механических свойств системы при одноосном сжатии образцов. Полученные значения модуля Юнга лежат в диапазоне 10–3500 кПа, что показывает возможность разработки материалов для замещения тканей вплоть до хрящевой.

Биосовместимость губчатых материалов на основе поли-L-лактида была исследована методами *in vitro* и *in vivo*. Проведенные эксперименты *in vitro* показали,

что данные материалы соответствуют требованиям, предъявляемым к биосовместимым медицинским изделиям. Также показано, что при *in vivo* имплантации пористые материалы активно колонизируются клетками соединительной ткани как при подкожной имплантации, так и при внутримембранной.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1362).

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ IN VITRO

Елена Викторовна Григорьева¹⁻⁴, Туяна Баировна Маланханова¹⁻⁴, Софья Викторовна Павлова¹⁻³, Елизавета Ивановна Устьянцева¹⁻⁴, Сергей Петрович Медведев¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴, Анастасия Александровна Малахова¹⁻⁴

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

evlena@bionet.nsc.ru

Изучение патологических механизмов, происходящих в нейральных клетках при развитии нейродегенеративных заболеваний, является важной задачей современной биомедицины. Разные патологические состояния соответствуют дегенерации различных типов нейронов. Так, при болезни Паркинсона гибнут дофаминергические, при спинальной мышечной атрофии и боковом амиотрофическом склерозе — моторные, болезни Гентингтона — срединные шипиковые, болезни Альцгеймера — кортексные нейроны. Однако в развитии данных заболеваний большую роль играют астроглиальные клетки, выполняющие многочисленные функции: опорную, трофическую, репаративную, гомеостатическую.

Перспективным направлением исследований нейродегенеративных заболеваний является создание клеточных моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), подвергшихся направленной дифференцировке в специализированные типы клеток. Для визуализации патологических процессов, происходящих в ИПСК и их производных на разных стадиях дифференцировки, популярным становится использование генетически-кодированных биосенсоров, а также внесение конструкций экспрессирующих флуоресцентные белки под промотором генов, специфичных для определенных типов клеток. Данные манипуляции стали возможными благодаря использованию инструмента геномного редактирования CRISPR/Cas9, который позволяет производить направленные манипуляции с геномом клеток.

Используя методы геномного редактирования, нами были созданы линии ИПСК, несущие в геноме репортерные конструкции экспрессии гена *GFAP*, специфичного для астроглии. Ведутся работы над повышением эффективности экспрессии флуоресцентного белка-репортера при направленной дифференцировке ИПСК в астроциты. Кроме того, нами получены линии ИПСК, несущие

в геноме конструкцию *roGFP-Grx1*, с которой экспрессируется биосенсор окислительно-восстановительного потенциала глутатиона. Проведена направленная дифференцировка данных линий в дофаминергические нейроны и показано изменение спектра возбуждения редокс-зависимого флуоресцентного белка *roGFP* при добавлении в культуральную среду перекиси водорода. Таким образом, созданы предпосылки для дальнейших исследований вклада астроцитов в развитие окислительного стресса нейронов, полученных из ИПСК пациентов с наследственными нейродегенеративными заболеваниями. Данные инструменты открывают перспективы в исследовании молекулярно-генетических механизмов патологий нейродегенеративных болезней и поиске мишеней для их терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10128П.

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС СТИМУЛИРУЕТ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В МЕЗЕНХИМНЫЕ КЛЕТКИ (ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНЫЙ ПЕРЕХОД)

Ольга Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна Григорьева, Мария Александровна Кулебякина, Анастасия Юрьевна Ефименко

Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

go.grigorievaolga@gmail.com

Эндотелиально-мезенхимный переход (эндоМП) играет важную роль как в эмбриональном развитии организма, поддерживая миграционную способность клеток, так и во взрослом организме, где он задействован в процессах заживления ран, патогенетических механизмах сердечно-сосудистых заболеваний (в частности атеросклероза), метастазировании и инвазии опухолей, в процессах фиброза тканей — например, при фиброзе легких. Существенная часть миофибробластов, преобладающих в зоне фиброза, происходит из эндотелия сосудистого русла. Несмотря на доказанную роль эндоМП в развитии фиброза, механизмы этого процесса изучены крайне недостаточно.

Основным и наиболее изученным фактором, запускающим ЭндоМП, является трансформирующий фактор роста TGF- β , однако малоизученными остаются другие факторы и процессы, такие как, например, окислительный стресс. Для изучения вклада окислительного стресса в процесс ЭндоМП использовали клетки эндотелия пупочной вены (HUVEC), которые культивировали на среде с добавлением TGF- β , H₂O₂, или их смеси.

По окончании 5 дней культивирования наиболее активный процесс ЭндоМП наблюдался в присутствии смеси TGF- β +H₂O₂. Экспрессия одного из основных маркеров миофибробластов, α -гладкомышечного актина — α SMA, в клетках эндотелия наблюдалась по данным иммуноцитохимического исследования под действием H₂O₂ и TGF- β +H₂O₂, однако по данным ПЦР уровень мРНК α SMA увеличивался только при культивировании со смесью TGF- β +H₂O₂. Кроме того, добавление TGF- β , H₂O₂ и их смеси приводило к увеличению экспрессии генов EDA-фибронектина и коллагена I типа и росту его синтеза и секреции, но при этом

во всех случаях эндотелиоциты сохраняли экспрессию маркера эндотелия — CD31. Литературные данные отдельных исследований указывают на важную роль белков внеклеточного матрикса в регуляции эндоМП. Так, использование фибронектина для покрытия пластика приводило к тому, что ЭндоМП наблюдался при добавлении как TGF- β +H₂O₂, так и H₂O₂.

Полученные данные свидетельствуют о способности окислительного стресса индуцировать эндотелиально-мезенхимный переход, что может вносить значительный вклад в фиброзирование тканей. При этом следует отметить, что для эффективной трансдифференцировки эндотелиоцитов недостаточно одного фактора, а требуется создание комплекса условий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-0043719.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ММСК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Ольга Сергеевна Гринаковская

ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

grinakovskaya@ya.ru

Костный мозг — уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Считается, что мезенхимные клетки костного мозга, находясь в стволовых нишах обладают продолжительным жизненным циклом, за счет чего могут сохранять свою «незрелость». Показано, что при длительном культивировании *in vitro*, мезенхимные МСК сохраняют высокий пролиферативный потенциал в течение длительного времени.

В настоящее время проводятся исследования по изучению свойств и биологических характеристик мезенхимных клеток при культивировании, однако данных об их биологическом возрасте крайне мало.

Целью исследования являлось изучение изменения характеристик, отражающих биологический возраст длительно живущих культур *ex vivo*.

Клетки КМ человека выделяли по стандартной методике в градиенте плотности, затем переносили в культуральные флаконы и культивировали в питательной среде DMEM-F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки. В работе использовали клетки 0 и 3 пассажей. Для проверки соответствия критериям ММСК, полученные клетки были охарактеризованы на проточном цитофлуориметре, по экспрессии маркеров (CD90, CD105, CD73, CD45) а также Oct-4 и SSEA-4. Для оценки количества SSEA4⁺ клеток использовали FAC-сортер.

Считается, что Oct4 и SSEA-4 — маркеры, характерные для эмбриональных стволовых клеток и iPS, свидетельствующие о высокой мультипотентной пластичности клеток, а также возможности дифференцировки клеток в экто- и мезодермальном направлениях. Последние исследования показали, что данные маркеры присутствуют также и на мультипотентных клетках, что подтверждается возможностью их дифференцировки как в эктодермальном, так и мезодермальном направлениях.

Фенотип клеток на 0 и 3 пассаже был CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD45⁻. Количество клеток, на которых экспрессируется Oct-4 и SSEA-4 на 0 пассаже составляло менее 10% от общего числа ММСК. На 3 пассаже было показано увеличение числа SSEA-4⁺ клеток до 35%, причем все эти клетки были также Oct-4-положительны.

Таким образом, исследование показало, что в процессе культивирования увеличивается доля мультипотентных Oct4⁺SSEA-4⁺ клеток в культуре, что, вероятно связано с сохранением раннего биологического возраста.

ПЕРТУРБАНТЫ ЦИТОСКЕЛЕТА ВЛИЯЮТ НА СЛИЯНИЕ И РАСПЛАСТЫВАНИЕ ХОНДРОСФЕР

Анна Александровна Грядунова^{1,2}, Сергей Александрович Родионов³, Елизавета Валерьевна Кудан², Юсеф Джорджевич Хесуани², Владимир Александрович Миронов¹⁻³, Елена Анатольевна Буланова²

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия;

³ Лаборатория соединительной ткани с группой клинической генетики, ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

agryadunova@bioprinting.ru

Тканевые сфероиды представляют собой трехмерные плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы. Одним из видов тканевых сфероидов являются хондросферы, состоящие из хондроцитов. К важнейшим свойствам хондросфер относится способность к слиянию и распластыванию на адгезивной поверхности, благодаря чему они находят широкое применение в замещении дефектов хрящевой ткани у пациентов с повреждениями суставного хряща. Несмотря на большое значение слияния и распластывания, до сих пор не проводилось систематического исследования влияния компонентов цитоскелета на течение данных процессов в трехмерной культуре. Данная работа посвящена изучению влияния пертурбатов цитоскелета на кинетику слияния и распластывания хондросфер.

В качестве источника клеток использовали первичные хондроциты барана. Тканевые сфероиды с концентрацией 8000 кл./сфероид получали с использованием планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, кат. #4520). В качестве пертурбатов цитоскелета использовали цитохалазин Д (Sigma-Aldrich, кат. #C8273) и нокодазол (Sigma-Aldrich, кат. #M1404) в концентрациях 10 μM и 1 μM, соответственно. Слияние хондросфер изучали, помещая сфероиды попарно в ячейки планшетов с низкоадгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, кат. #4520). Распластывание хондросфер проводили в ячейках 96-луночного планшета с плоским дном (Corning, кат. #3595).

Анализ кинетики слияния хондросфер в точках 0, 24, 48 и 144 часа показал, что при обработке цитохалазином Д, вызывающим деполимеризацию микрофиламентов, происходит полная остановка слияния: помещенные рядом тканевые сфероиды соприкасаются друг с другом, но не формируют единый конструктор в течение 144 часов культивирования. В то же время, обработка нокодазолом, инициирующим деполимеризацию микротрубочек, не оказывает существенного влияния на процесс слияния по сравнению с контрольной группой. При этом при анализе кинетики распластывания

хондросфер в тех же временных точках было обнаружено, что оба агента обладают ингибирующим влиянием на распластывание сфероидов.

Таким образом, в ходе данного исследования было установлено, что в процессе слияния хондросфер значительную роль играют актиновые микрофиламенты, при деполимеризации которых происходит полная остановка слияния; тогда как на кинетику распластывания хондросфер в равной мере влияют и микрофиламенты, и микротрубочки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90017.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОТОКОВ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Елена Вячеславовна Дементьева¹⁻³, Михаил Михайлович Слотвицкий⁴, Юрий Викторович Вяткин^{5,6}, Евгений Иванович Кретов², Виктория Романовна Коваленко^{1-3,5}, Сергей Петрович Медведев^{1-3,5}, Дмитрий Николаевич Штокало^{6,7}, Сурен Минасович Закиян^{1-3,5}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия;

⁵ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁶ ООО Новые программные системы, Новосибирск, Россия;

⁷ Институт систем информатики им. А.П. Ершова, Сибирское отделение РАН, Новосибирск, Россия

dementyeva_elena@mail.ru

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — одно из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний, однако механизмы его развития до сих пор недостаточно хорошо изучены. Для кардиомиоцитов пациентов с ГКМП характерны увеличенный размер, дезорганизация саркомеров и миофибрилл, более высокая частота аритмических событий. Гипертрофическое ремоделирование кардиомиоцитов и их склонность к аритмиям обусловлены повышенной внутриклеточной концентрацией ионов кальция, которая является следствием нарушения динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах.

В данной работе было проведено исследование динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах, полученных с помощью направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с ГКМП. Генетический анализ 15 пациентов с ГКМП выявил мутации в генах, ассоциированных с данным заболеванием. От пациентов с мутациями p.M659I в гене MYH7 и p.R326Q в гене MYBPC3 получены пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В результате направленной

дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с ГКМП и здорового донора были получены кардиомиоциты. На 40 день дифференцировки кардиомиоциты с мутациями p.M659I в гене *MYH7* и p.R326Q в гене *MYBPC3* демонстрировали первые изменения в динамике потоков ионов кальция по сравнению с контрольными кардиомиоцитами. На 74 день дифференцировки в кардиомиоцитах с мутацией p.R326Q в гене *MYBPC3* было нарушено регулярное чередование процессов выброса и обратного захвата ионов кальция, увеличено время обратного захвата ионов кальция саркоплазматическим ретикуломом и повышена внутриклеточная концентрация ионов кальция в состоянии покоя. Выявленные нарушения динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах с мутациями p.M659I в гене *MYH7* и p.R326Q в гене *MYBPC3* позволяют использовать полученные клетки для исследования молекулярных механизмов ГКМП.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-75-10039.

УРОКИНАЗНЫЙ РЕЦЕПТОР УЧАСТВУЕТ В АДГЕЗИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА К ВИТРОНЕКТИНУ

**Константин Владимирович Дергилев,
Зоя Ивановна Цоколаева, Ирина Борисовна
Белоглазова, Екатерина Сергеевна
Зубкова, Елизавета Израилевна Ратнер,
Елена Викторовна Парфенова**

*ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России,
Москва, Россия*

doctorkote@gmail.com

Витронектин (Vn) является белком внеклеточного матрикса, который играет важную роль в эмбриональном развитии, а также репарации органов и тканей. Уникальной особенностью Vn является его способность специфически связывать различные биологические молекулы, включая урокиназный рецептор (uPAR), компоненты внеклеточного матрикса, рецепторы адгезии, ростовые факторы, и др., обеспечивая модуляцию поведения клеток.

Цель исследования: оценить экспрессию Vn в поврежденном сердце и исследовать его влияния на адгезионные свойства прогениторных клеток сердца (ПКС).

Методы. В работе использованы ПКС, полученные из миокарда мышей линий WT C57Bl6/129 и uPAR^{-/-} C57Bl6/129. Исследование экспрессии Vn в миокарде оценивали с помощью ПЦР РВ и иммуногистохимии. ПКС идентифицировали в миокарда с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания с последующим количественным подсчетом в программе Image J. Ингибирование uPAR в ПКС из миокарда мышей дикого типа проводили с помощью антител ("R&D"). Уровень адгезии клеток исследовали с помощью Adhesion assay.

Результаты. Показано, что в острую стадию инфаркта миокарда происходит накопление Vn, который преимущественно локализуется в зоне повреждения и фактически отсутствует в неповрежденном миокарде. Начиная с 7 дня его распределение в сердце уменьшается и практически полностью исчезает через 2 недели, когда завершается формирование постинфарктного рубца. Первая неделя после острого ишемического повреждения наряду с накоплением Vn характеризуется аккумуляцией ПКС, которые преимущественно локализируются именно в области накопления витронектина. Учитывая эти данные, а также то, что Vn является одним

из лигандов uPAR, были проведены исследования влияния адгезии ПКС на Vn в зависимости от наличия или отсутствия uPAR. Установлено, что WT клетки проявляли более выраженную способность к адгезии на Vn, чем ПКС из миокарда мышей, нокаутированных по гену uPAR. Кроме того, ингибирование uPAR специфическими антителами на поверхности WT ПКС приводило к снижению их способности к адгезии и расщеплению на витронектиновом матриксе.

Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия uPAR на поверхности ПКС может выступать в качестве регулятора их адгезионных свойств. Взаимодействие uPAR и Vn может быть как независимым от интегринов, так и являться следствием активации различных интегринов, тем самым модулируя выбор матрикса для взаимодействия, что может влиять на накопление ПКС в зоне повреждения после инфаркта.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01368.

УРОКИНАЗНЫЙ РЕЦЕПТОР МОДУЛИРУЕТ ПОВЕДЕНИЕ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА И ОПРЕДЕЛЯЕТ ИХ РЕПАРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОСЛЕ ИНФАРКТА

**Константин Владимирович Дергилев,
Зоя Ивановна Цоколаева, Ирина Борисовна
Белоглазова, Екатерина Сергеевна
Зубкова, Елизавета Израилевна Ратнер,
Елена Викторовна Парфенова**

*ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России,
Москва, Россия*

doctorkote@gmail.com

Прогениторные клетки сердца (ПКС) являются важным регулятором клеточного гомеостаза и участником репаративных процессов в сердце. Несмотря на многообещающие результаты доклинических и клинических исследований по трансплантации ПКС при инфаркте и хронической сердечной недостаточности механизмы регуляции функций этого типа клеток малоизучены. Известно, что урокиназный рецептор (uPAR), присутствующий на поверхности многих типов клеток, участвует в регуляции множества клеточных функций. Однако, его роль в регуляции репаративных функций ПКС не установлена.

Цель исследования: изучить влияние uPAR на устойчивость к апоптозу, пролиферативные свойства ПКС и их участие в репарации после инфаркта.

Методы. В работе использованы ПКС, полученные из миокарда мышей линии C57Bl6 с помощью метода эксплантаной культуры и последующей иммуномагнитной селекции. Оценку иммунофенотипа проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Подавление экспрессии uPAR выполняли с использованием shRNA лентивирусных частиц ("Santa Cruz") и последующей селекции на пуromицине. Оценка выживаемости клеток выполнялась MTT тестом, апоптоза — Caspase-Glo® 3/7 Assay System. Оценка репаративных свойств ПКС проводилась на модели инфаркта миокарда с последующей оценкой функции сердца с помощью эхокардиографии.

Результаты. Показано, что uPAR присутствует на поверхности большинства ПКС и его взаимодействие с лигандом (витронектином) увеличивает пролиферативный потенциал этих клеток. Подавление uPAR приводило к подавлению клонообразования и способности к делению как в присутствии витронектина, так и без него.

uPAR(-) клетки были более подвержены гибели при культивировании в отсутствие сыворотки и под действием H₂O₂ индуцированного стресса. Интрамиокардиальная трансплантация uPAR (+) ПКС после инфаркта миокарда способствовала увеличению показателей систолической функции сердца, в то время как трансплантация uPAR (-) клеток или контрольной среды такого эффекта не вызывала.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия uPAR может способствовать выживаемости ПКС после трансплантации и регулирует репаративные свойства этих клеток. Механизмы этого влияния uPAR являются предметом дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-15-01368, РФФИ № 19-015-00231.

УРОКИНАЗНЫЙ РЕЦЕПТОР РЕГУЛИРУЕТ ФОРМИРОВАНИЕ КАРДИОСФЕР

Константин Владимирович Дергилев, Зоя Ивановна Цоколаева, Юлия Дмитриевна Василец, Елизавета Израилевна Ратнер, Елена Викторовна Парфенова

ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

doctorokote@gmail.com

В настоящее время технология использования сфероидов (СФ) на основе клеток миокарда является новым перспективным направлением клеточной терапии повреждений сердца, повышающим ее эффективность. Однако для клеточной терапии необходимо получение стандартизированной культуры кардиосфер (КС), имеющих определенный размер, клеточный состав и репаративные свойства. Формирование 3D клеточной структуры требует скоординированной работы различных сигнальных механизмов, включая урокиназную систему, контролирующую адгезию клеток к матриксу, межклеточные взаимодействия, пролиферацию и поверхностное натяжение клеток первичного СФ.

Цель исследования: изучить влияние урокиназного рецептора (uPAR) на формирование КС из клеток миокарда.

Методы. В работе использованы КС, полученные из миокарда мышей линий WT C57Bl6/129 и uPAR-/- C57Bl6/129 с помощью метода экплантанной культуры и последующей сборки СФ на чашках с поли-Д-лизином в среде с низким содержанием сыворотки. Подавление экспрессии uPAR в Wt клетках выполняли с использованием shRNA лентивирусных частиц ("Santa Cruz") и последующей селекцией на пурамицине. Оценка размера и количества СФ проводили с помощью программы Image J. Уровень адгезии клеток исследовали с помощью Adhesion assay.

Результаты. Показано, что uPAR присутствует на поверхности 71±8% кардиосферообразующих клеток в составе 2D культуры и собранных СФ. Были выявлены различия в формировании СФ из Wt и uPAR-/- клеток. Через сутки после посадки на культуральные чашки клеточных суспензий наблюдалось формирование первичных клеточных агрегатов, которые являются «ядром», инициирующим сборку СФ. При этом если в культуре Wt клеток наряду с ними, наблюдались полностью собранные СФ, то в культуре uPAR-/- клеток они отсутствовали. Через 2 суток с момента посадки клеток, сформированные СФ наблюдались в обеих культурах. В культуре Wt клеток выявлялись СФ адгезионного и неадгезионного типа крупного размера

(100–150 мкм). uPAR-/- клетки формировали в 3 раза большее количество СФ, чем Wt клетки, но они имели преимущественно мелкий размер (менее 50 мкм). Подавление uPAR с помощью специфических shRNA снижало адгезионные свойства клеток и приводило к нарушению сборки СФ и появлению КС меньшего размера.

Таким образом, uPAR, оказывая влияние на адгезионные свойства кардиосферообразующих клеток, регулирует сборку СФ. Регулируя экспрессию uPAR можно получать КС разного размера, что может быть важно для их использования в клеточной терапии заболеваний сердца.

Грант РФФИ № 17-15-01368.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОСВЯЗИ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КОНТЕКСТЕ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОСТИ

Павел Дерябин, Анастасия Грюкова, Алла Шатрова, Николай Никольский, Александра Бородкина

Лаборатория внутриклеточной сигнализации, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

borodkina618@gmail.com

Сегодня клеточное старение принято рассматривать как физиологическую реакцию пролиферирующих клеток на повреждение ДНК. Присутствие стареющих клеток в тканях может обуславливать их дисфункцию. Настоящая работа посвящена исследованию взаимосвязи между процессами старения и тканеспецифичной децидуальной дифференцировки эндометриальных стромальных клеток.

ЭСК являются основным компонентом стромы эндометрия и отвечают за циклическое восстановление функционального слоя и его гормон-индуцированную децидуализацию, необходимую для имплантации эмбриона. На начальном этапе исследований мы оценили способность стареющих ЭСК к децидуальной дифференцировке. Посредством оценки мезенхимально-эпителиального перехода, соответствующих морфологических изменений, экспрессии ключевых маркеров децидуальных клеток — PRL, IGFBP-1 и фактора транскрипции FOXO1 — мы установили, что по сравнению с контрольными клетками стареющие ЭСК практически полностью утрачивают способность децидуализоваться. Дальнейший анализ позволил установить, что наблюдаемый эффект может быть связан с нарушением в стареющих ЭСК ядерного транспорта рецептора прогестерона.

Помимо нарушенного функционирования самих стареющих ЭСК, последствия их присутствия в ткани могут быть обусловлены изменением их паракринной активности. При помощи масс-спектрометрии высокого разрешения мы установили существенные отличия в профилях факторов, секретлируемых контрольными и старыми ЭСК. Используя 2D и 3D модели, мы обнаружили, что ко-культивирование со стареющими ЭСК (1) вызывает паракринное старение и (2) нарушает децидуализацию соседних молодых клеток. Важно, что эффекты прямого ко-культивирования со стареющими клетками воспроизводились при использовании кондиционированной среды, содержащей факторы, секретлируемые стареющими ЭСК. Таким образом, можно выделить несколько последствий присутствия стареющих клеток в строме эндометрия: во-первых, дифференцировочный

и пролиферативный потенциал стареющих эСК снижен, что может негативно влиять на пластичность эндометрия, во-вторых, за счет измененной паракринной активности стареющие эСК могут обуславливать распространение старения на соседние клетки, а также подавлять децидуализацию нормальных клеток микроокружения. Эти результаты демонстрируют возможный вклад стареющих эСК в нарушения пластичности и рецептивности ткани эндометрия и впоследствии могут лечь в основу разработки подхода для лечения женского бесплодия.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-10038.

УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ СИНГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ММСК) ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ РАДИАЦИОННЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Юрий Борисович Дешево¹, Тамара Алексеевна Насонова¹, Ольга Александровна Добрынина¹, Роман Вадимович Деев^{2,3}, Владимир Георгиевич Лебедев¹, Алла Васильевна Лырщикова¹, Татьяна Алексеевна Астрелина¹, Борис Борисович Мороз¹

¹ ФМБЦ им Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия;

² Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

³ «Институт Стволовых клеток человека», Москва, Россия

iury.deshevoi@yandex.ru

Тяжелые лучевые поражения кожи, встречающиеся в клинической практике, сопровождаются серьезными осложнениями и трудно поддаются стандартным, консервативным способам лечения. В связи с этим в последние годы разрабатываются методы клеточной терапии данной патологии.

В настоящей работе обобщены данные, полученные в ряде экспериментов, где изучалась эффективность сингенных культивированных ММСК жировой ткани при лечении тяжелых радиационных поражений кожи. Опыты проведены на крысах инбредной линии Wistar-Kyoto, которых подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30кВ, сила тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al), при мощности дозы 17,3–20,0 Гр/мин. Площадь поля облучения на поверхности кожи — 8,5 см². Такое облучение позволяло получать тяжелые поражения кожи с длительно (до 3,5 месяцев) незаживающими лучевыми язвами, без критической лучевой нагрузки на подлежащие ткани. Клинические проявления радиационного поражения кожи у крыс развивались постепенно. После короткого латентного периода, на 8–10 сутки у облученных животных наблюдали симптомы сухого дерматита. К 13–15 суткам сухой дерматит переходил во влажный. К концу 3 недели после воздействия радиации на коже крыс (в центре зоны облучения) образовывались язвы, покрытые плотным струпом. Затем происходило постепенное заживление язв с образованием атрофического рубца к 90–110 суткам после облучения или процесс приобретал хронический характер.

В связи с этапным развитием патологического процесса в пораженной коже проведена оценка

эффективности клеточной терапии в различные сроки после облучения: в ранний период формирования язвы, в период сформировавшейся язвы и в периоды активной регенерации в пораженной ткани.

Суспензию ММСК (87–93% живых клеток) в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили под кожу в 5 точек вокруг зоны поражения, отступив 5–7 мм от края очага. Количество введенных ММСК при одной трансплантации в разных опытах составляло от 1,5 до 3,5×10⁶ клеток. Проводили как однократные, так и двукратные трансплантации клеток. Показано, что только двукратное введение ММСК (с интервалом между инъекциями в 1 неделю) усиливает регенераторные процессы и убыстряет заживление лучевых язв. Терапевтический эффект более выражен в условиях двукратного введения ММСК в периоды, когда лучевая язва уже сформирована и в пораженной коже активизируются регенераторные процессы.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА C-KIT/SCF-R В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Ольга Владимировна Дилекова, Василиса Васильевна Митенко

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Россия

dilekova2009@yandex.ru

В работе исследована поджелудочная железа свиней, собак и кошек от суточного до 3-летнего возраста. Применяли моноклональные мышинные антитела к SCF-R (c-kit) (DiagnosticBioSystems, Нидерланды, 1:20–1:40), моноклональные кроличьи антитела к CD117/c-kit (SpringBioScience, США). Статистическую обработку проводили методом однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественных сравнений Ньюмена-Кейсла. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. У исследованных млекопитающих c-kit⁺ клетки идентифицируются в эндокринных островках, повторяя схему локализации β-эндокриноцитов. У свиней количество c-kit⁺ клеток в суточном возрасте составляет 18,17% от общего количества эндокриноцитов. С суточного до месячного возраста их количество снижается на 55,24%, что составляет 12,84%; с 1- до 6-месячного возраста повышается до 21,63%; в годовалом возрасте снижается на 79,85%, до 10,04%; с 1 года до 3 лет жизни повышается на 22,22%, однако в эндокринном островке данный показатель составляет 9,38% от общего количества эндокриноцитов. ЯЦО c-kit⁺ клеток в возрастном аспекте не претерпевает достоверных различий и составляет 0,20±0,008. У собак в суточном возрасте количество c-kit⁺ клеток составляет 26,02% от общего количества эндокриноцитов в островке. С суточного до 3-месячного возраста их количество снижается до 9,22%, а затем к 1 году жизни увеличивается до 13,93%. С 1 года до 3 лет их количество снижается на 29,80% и составляет 9,30%. ЯЦО c-kit⁺ клеток в 1-суточном возрасте составляет 0,21±0,008. С 1- до 3-месячного возраста снижается на 43,57%, с 3- до 6-месячного возраста увеличивается на 58,57%, в 1 год жизни снижается на 29,83%, в 3-летнем возрасте увеличивается на 18,13% и составляет 0,20±0,004. У кошек количество c-kit⁺ клеток в эндокринном островке в суточном возрасте составляет 27,98%. С суточного до месячного возраста их количество снижается в 3,8 раза, до 7,87%; с 1- до 6-месячного возраста увеличивается до 13,81%;

в 1 год снижается на 38,70%, до 8,19%; с 1 года до 3 лет увеличивается на 64,08% и составляет 19,69% в эндокринном островке. ЯЦО *skit⁺* клеток в суточном возрасте составляет $0,18 \pm 0,008$. С 1- до 3-месячного возраста снижается на 17,53%, с 3 до 6 месяцев увеличивается на 29,22% и составляет $0,19 \pm 0,008$, после чего не изменяется до 3-летнего возраста кошек. Таким образом, *c-kit⁺* клетки в поджелудочной железе млекопитающих являются динамическим показателем, отражающим регенераторный потенциал эндокриноцитов железы.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH И ГЕНОВ РАННЕГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ В МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТКАХ СЕРДЦА ПРИ ОСТРОМ ГИПОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Павел Михайлович Докшин¹, Андрей Александрович Карпов¹, Анна Борисовна Малашичева^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

p.docshin@gmail.com

Восстановление сократительной функции сердца после инфаркта миокарда является актуальной проблемой современной регенеративной медицины. Открытие и экспериментальное использование мезенхимных клеток сердца (МКС) стало новой вехой в развитии клеточной терапии «нового поколения». Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе репаративных процессов, остаются малоизученными. Было показано, что при остром гипоксическом поражении миокарда в периинфарктной области повышается экспрессия гена *notch1* и усиливается пролиферация клеток. Известно, что передача сигналов Notch имеет важное значение в кардиогенезе, клеточной дифференцировке и в поддержании популяции стволовых клеток в постнатальном периоде. Участвует ли Notch-сигналинг в процессах, определяющих степень ремоделирования сердца после инфаркта миокарда, остаётся неясным.

Целью нашего исследования было проведение анализа роли сигнального пути Notch и связанных с ним генов раннего ремоделирования в активации регенеративного потенциала МКС.

Развитие инфаркта миокарда у крыс индуцировали посредством лигирования левой коронарной артерии. МКС были получены из ишемизированной области путём ферментативной диссоциации ткани; в качестве контроля были использованы МКС из здорового миокарда ложнопериорированных крыс. Гипоксию *in vitro* индуцировали за счёт инкубирования здоровых МКС в условиях низкого содержания кислорода (1%) в воздушной камере на протяжении 48 часов. Искусственную активацию Notch в МКС проводили путём внесения NICD на лентивирусном носителе. Экспрессию целевых генов оценивали с помощью qPCR.

Ишемическое воздействие вызвало активацию генов сигнального пути Notch и *runx2/bmp2* в ткани сердечной мышцы, а также в МКС, полученных из периинфарктной области. Последние имели больший потенциал к миграции, пролиферации и дифференцировке. Индуцированная гипоксия *in vitro* в контрольных МКС также вызвала активацию генов сигнального пути Notch и *runx2/bmp2*. Введение NICD дозозависимо активировало *runx2*.

Таким образом, гипоксический стресс индуцирует кратковременную активацию регенеративного потенциала МКС, и в этих процессах задействованы компоненты сигнального пути Notch и гены раннего ремоделирования *bmp2* и *runx2*. Запланированы дальнейшие исследования этого феномена.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ОБРАБОТКИ ПОВЕРХНОСТИ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА УРОВЕНЬ АТФ МСК ПУЛЬПЫ ЗУБА ЧЕЛОВЕКА

Александр Александрович Долгалев, Дмитрий Викторович Бобрышев, Николай Николаевич Диденко, Виктор Иванович Зеленский

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

nikolai.n.didenko@gmail.com

Изменение микро- и наноструктуры поверхности имплантата является ключом к оптимальной остеоинтеграции. При этом в доступной литературе практически отсутствуют исследования по изучению влияния различных видов поверхности имплантата на клетки и ткани, с которыми она контактирует.

Цель исследования: изучение уровня внутриклеточного АТФ МСК пульпы зуба человека, культивированных в присутствии образцов титановых сплавов, поверхность которых была обработана различными способами.

Материалы и методы. Первичные культуры МСК пульпы зуба человека, полученные из удаленных по ортодонтическим показаниям третьих моляров, культивировали при 37°C и 5% CO₂ в пластиковых культуральных флаконах 25 см², содержащих полную питательную среду. На третьем пассаже клетки высевались в 24-луночные планшеты по 3×10^4 клеток на лунку. По достижении 70–80% конfluenceности в лунки помещали образцы исследуемых материалов.

Люминесцентный анализ уровня АТФ проводился через 24 и 48 ч с использованием ATPlite 1 step (PerkinElmer) при помощи фотометра-имиджера Cytation 1 (BioTek). Подсчет клеток и уровня их жизнеспособности проводился при помощи автоматического счетчика LounaFL (LogosBio). Различия средних величин уровня АТФ оценивались при помощи t-критерия Стьюдента и считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При анализе уровня АТФ в культивируемых клетках через 24 и 48 ч после внесения образцов титановых сплавов наибольший результат получен у клеток, культивированных в присутствии образца титано-ванадиевого сплава с покрытием нанодисперсным углеродом BT-6 DLC, наименьшим — в присутствии BT-6 с ультразвуковой обработкой ($t = 6,23$; $p < 0,05$). При этом уровень АТФ в клетках, культивированных в присутствии образца материала BT-6 DLC, достоверно не отличался от уровня АТФ в клетках, культивированных в присутствии чистого титанового сплава BT1-0 ($t = 0,18$; $p > 0,5$). Наибольший прирост уровня АТФ за вторые сутки показаны у клеток, культивированных в присутствии образца материала с магнетронным покрытием титаном, мощность 200 Ватт (BT-6 W 200) (+96,4%), несколько меньше — в присутствии BT-6 DLC (+88,3%), наименьшая — в присутствии образца с нанодисперсным покрытием диоксида титана (BT-6 TiO₂) (+17,60%).

Заключение. Таким образом, клетки, культивированные в присутствии образца BT-6 DLC, обладают

наибольшим уровнем АТФ по сравнению с другими исследуемыми образцами, что говорит о положительном влиянии данного способа обработки поверхности материала с точки зрения биофункциональности.

ТИТАНОВЫЕ ИМПЛАНТАТЫ С НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ КАК МАТЕРИАЛ-НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ (NCSC) НА МОДЕЛИ СТАНДАРТИЗИРОВАННОГО КОСТНОГО ДЕФЕКТА

Александр Александрович Долгалев¹, Виктор Иванович Зеленский¹, Игорь Владимирович Ржепаковский², Николай Николаевич Диденко³

¹ Кафедра стоматологии общей практики и детской стоматологии, Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия;

² Институт живых систем, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия;

³ Лаборатория регенеративной медицины, Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

dolgalev@dolgalev.pro

Рентгеновская микротомография является методом микроструктурного анализа, обладающий высоким уровнем детализации и позволяющий расширить возможности оценки внутренней архитектуры органов и тканей с применением их 3Д реконструкции. Преимуществом данного метода перед морфологическими является то, что нет необходимости разделять исходный материал на срезы и шлифы. Специфику работы с подобным оборудованием можно разделить на две части, это проведение исследований *in vivo* и *in vitro*, то есть работа с живыми лабораторными животными по или изучение органов и тканей, отделенных от животного.

В рамках этого исследования нами проведен микроКТ анализ остеоинтеграции имплантатов в зону нижней челюсти и в крыло подвздошной кости экспериментальных животных (овец) в норме и при экспериментальном остеопорозе. Животным контрольной и опытной групп были установлены дентальные имплантаты в нижний край нижней челюсти и передний край крыла подвздошной кости. Животных вывели из эксперимента через 30 и 90 дней. Образцы костных тканей, фиксировались в 10% забуференном растворе формалина. Для сканирования и обработки материалов использовали рентгеновский микротомограф Skyscan 1176 (Bruker-microCT, Бельгия) и программное обеспечение Skyscan 1176 control program (1.0.0.0), Nrecon (1.7.4.2), DataViewer (1.5.6.2), CT-analyser (1.18.4.0), CTvox (3.3.Or1403). Сканирование каждого фрагмента кости проводилось вместе с двумя фантомами (0,25 и 0,75 г/см³ гидроксиапатита кальция) имеющими диаметр соответствующий толщине исследуемых проб. В зависимости от размеров пробы и ее толщины использовалось разрешение от 9 до 36 мкм и два фильтра (Cu+Al и Cu O,1 мм).

Анализ внедрения различных имплантатов в подвздошную кость показал, что уровнем лучшей имплантации по сравнению с другими отличались «BT6+M5 (магнетрон)» и «BT6 с», у остальных уровень имплантации достоверно не изменялся, по уровню состояния костной ткани вокруг имплантата все изделия значительных отличий не имели.

Анализ внедрения различных имплантатов в нижнюю челюсть, показал в апикальной части, лучший уровень имплантации у изделий «BT1-О не обр.», а также «BT6+M5 (магнетрон)», кроме того процентное содержание костной ткани вокруг имплантатов было больше у изделий «BT1-О не обр.», «BT6+DLC» и «IRIS», причем последний отличался наиболее равномерным заполнением губчатой костной тканью по всей исследуемой поверхности.

НОВЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА НОВООБРАЗОВАННЫХ РЕГЕНЕРАТОВ ПОСЛЕ ХОНДРОПЛАСТИКИ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОПЛАЗМОЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Дмитрий Александрович Долгушкин¹, Владимир Анатольевич Лазарев¹, Наталья Николаевна Сарбаева¹, Павел Михайлович Зельтер²

¹ ИЭМБ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия;

² Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

dirol900@yandex.ru

Введение. Экспериментальных работ для оценки эффективности хондропластики и оценки качества восстановления регенератов у животных с помощью компьютерной томографии крайне мало, а результаты их противоречивы.

Целью работы является оценка эффективности хондропластики обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмой (ОТП) в эксперименте у кроликов с помощью компьютерной томографии.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе Института экспериментальной хирургии и биотехнологий СамГМУ. Работа проведена на 30 кроликах породы «Шиншилла» массой 2,5–3 кг, возрастом 1–1,5 года. Всем животным моделировали костно-хрящевые дефекты надколенниковой суставной поверхности бедренной кости. Контрольной группой выступали животные без последующей пластики дефектов. Первой опытной группой животных осуществляли пластику дефектов ОТП, второй – заполняли дефекты бионосителем – деминерализованной лиофилизированной спонгиозой, изготовленной по методике «Лиопласт». Оценку восстановления области пластики осуществляли с помощью разработанного способа оценки качества регенерата с помощью компьютерной томографии, спустя 2 недели, 1,2,3 месяца после операции.

Результаты и их обсуждение. Предложенный эффективный способ оценки качества регенератов после хондропластики разными способами позволил в динамике выявить отличия процессов восстановления тканей области дефекта. Были оценены качественные и количественные показатели плотности новообразованной ткани в области дефектов в целом, а также изолированно — на уровне гиалинового хряща, субхондральной кости и промежуточной зоне регенерата.

Выводы. Результаты компьютерной томографии показали, что, если на ранних сроках после хондропластики обогащенной тромбоцитами аутоплазмой регенераты по своим качественным и количественным характеристикам значительно уступали аналогичным показателям интактных тканей, то ко 2 месяцу наблюдения значения плотности этих регенератов были сравнимы с этими показателями. А к 3 месяцу наблюдений превосходили

аналогичные показатели в группе животных, которым была выполнена пластика дефектов деминерализованной костью. Это позволяет рассматривать ОТП, как возможный и эффективный субстрат для выполнения пластики дефектов суставной поверхности.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ ПРИ ХОНДРОПЛАСТИКЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРОЛИКОВ

Дмитрий Александрович Долгушкин, Владимир Анатольевич Лазарев, Наталья Николаевна Сарбаева, Лариса Теодоровна Волова

ИЗМБ ФГБОУ ВО Самарский Государственный Медицинский Университет Минздрава России, Самара, Россия

dodipesa@yandex.ru

Введение. Проблема поиска оптимального способа восстановления дефектов суставного гиалинового хряща является актуальной для современной ортопедии. Помимо оперативных методик, таких как микрофрактурирование, субхондральная туннелизация, мозаичная хондропластика для восстановления суставной поверхности в последние годы предложены новые биоматериалы и клеточные технологии. Многие из новых методик являются сложными и дорогостоящими. При этом во многих областях медицины для регенерации тканей с успехом применяют обогащенную тромбоцитами аутологичную плазму. Представляет интерес изучение ее регенеративных свойств при хондропластике костно-хрящевых дефектов суставной поверхности в эксперименте у животных.

Целью работы являлась оценка эффективности использования обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы (ОТП) при лечении остеохондральных поврежденных коленного сустава кролика.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе Института экспериментальной хирургии и биотехнологий СамГМУ. Работа проведена на 30 кроликах породы «Шиншилла» массой 2,5–3 кг, возрастом 8–12 месяцев. Всем животным моделировали костно-хрящевые дефекты надколенниковой суставной поверхности бедренной кости. Контрольной группой выступали животные без последующей пластики дефектов. Первой опытной группе животных осуществляли пластику дефектов ОТП, второй — заполняли дефекты бионосителем — деминерализованной лиофилизированной спонгиозой, изготовленной по методике «Лиопласт». Третьей группе выполняли пластику комбинацией ОТП и бионосителя. Оценку восстановления функции конечностей животных оценивали с помощью комплекса биомеханических методов исследования, структур сустава — с помощью рентгенологических методов, выполняли морфологическое исследование. Результаты оценивали спустя 2 недели, 1, 2, 3 месяца после операции.

Результаты и их обсуждение. Основной группой наблюдения, безусловно, была группа кроликов, которым выполняли монопластику костно-хрящевых дефектов ОТП. В этой группе животных, по сравнению с остальными, отмечали наиболее быстрое купирование послеоперационных явлений — боли, отека, отмечали раннее восстановление опороспособности и функции конечностей. При морфологическом исследовании результаты замещения дефектов суставной поверхности

органотипичными тканями в этой группе животных наблюдали также часто, как и при выполнении комбинированной пластики дефектов ОТП и деминерализованными костными бионосителями. Это позволяет говорить о высоком регенеративном потенциале ОТП.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТЕЛОВОЫЕ КЛЕТКИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ НА БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕДАХ, СОХРАНЯЮТ СТЕЛОВОЫЕ СВОЙСТВА И ПРОЯВЛЯЮТ ПОВЫШЕННУЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ОРГАНИЗАЦИИ В СФЕРОИДЫ

Алиса Павловна Домнина, Лариса Леонидовна Алексеенко, Ирина Исааковна Фридлянская, Ольга Генадьевна Люблинская, Ирина Викторовна Кожухарова, Николай Николаевич Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

aldomnina@mail.ru

Трансплантация стволовых клеток широко исследуется как альтернативный метод лечения различных заболеваний. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) имеют большие перспективы в биоинженерии и регенеративной медицине благодаря своей мультипотентности, иммуносупрессорным свойствам и высокому пролиферативному потенциалу. Для выделения и культивирования МСК обычно применяются культуральные среды, содержащих компоненты животного происхождения. Чаще всего используют сыворотку эмбрионов коров. Присутствие сыворотки ограничивает исследовательское и клиническое применение клеток поскольку состав сыворотки не полностью определен, могут быть отличия от партии к партии при производстве, кроме того возможно возникновение иммунологических реакций у пациентов и имеется риск контаминации сыворотки возбудителями опасных заболеваний. В связи с этим проводятся множественные исследования по использованию для культивирования МСК бессывороточных культуральных сред.

В данной работе мы оценивали терапевтические свойства МСК, выделенных из менструальной крови человека (эМСК), культивируемых в виде сфероидов в нескольких видах бессывороточных сред. Было обнаружено, что эМСК, организованные в сфероиды, культивируемые в бессывороточных средах сохраняют экспрессию поверхностных CD маркеров, способность к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении, а также проявляют повышенную экспрессию ангиогенных и противовоспалительных генов, таких как TSG-6, HGF и EP2. Так же было обнаружено, что трансплантация эМСК в сфероидах на модели заживления ран у крыс стимулирует образование грануляционной ткани и ускоряет эпителизацию и полное закрытие раны по сравнению с введением эМСК после культивирования в монослое. Предполагается, что улучшенный терапевтический эффект реализуется за счет усиления секреции ангиогенных и противовоспалительных факторов при агрегации эМСК в сфероиды. Таким образом, культивирование эМСК в сфероидах с использованием сред, не содержащих сыворотку, сохраняет их регенеративный потенциал.

Работа была поддержана Российским научным фондом (проект 19-14-00108) и программой научных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

АКТИВАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ- α ПРОИСХОДИТ ПРИ УЧАСТИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β

Алена Игоревна Дорофеева, Ирина Николаевна Шипунова, Наталия Арнольдовна Петинати, Алексей Евгеньевич Бигильдеев, Нина Иосифовна Дризе

Лаборатория физиологии кроветворения, Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России, Москва, Россия

Resnichka22-22@mail.ru

Мультipotентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) человека — привлекательный объект исследования и применения в регенеративной медицине, гематологии и в терапии аутоиммунных заболеваний ввиду возможности направить их дифференцировку в костном, хрящевом и жировом направлениях, а также вследствие их иммуномодулирующих способностей. Для того, чтобы ММСК наиболее эффективно проявили последние, клетки можно активировать с помощью интерферона γ (IFN γ), фактора некроза опухолей- α (TNF α) или других веществ. В работе изучали последствия активации ММСК TNF α и IFN γ и установили связь с сигнальным путем интерлейкина-1 β (IL1 β).

ММСК человека были получены от 5 доноров костного мозга (2 мужчины/3 женщины в возрасте от 18 до 40 лет) во время плановой эксфузии после подписания ими информированного согласия. Культуры клеток вели в стандартных условиях в среде α MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. К ММСК двух доноров однократно были добавлены 20 нг/мл TNF α и 500 ед/мл IFN γ . Через 1, 2, 3 и 4 суток после активации из клеток выделяли РНК и оценивали экспрессию IL1 β с помощью ОТ-ПЦР. К ММСК трех других доноров добавляли TNF α до концентрации 10 нг/мл два раза в неделю при каждой смене среды. Культуры вели в течение 4 пассажей, после чего культивировали клетки один дополнительный пассаж без TNF α . Оценивали суммарную клеточную продукцию. Из клеток выделяли РНК и ДНК, оценивали уровень экспрессии IL1 β .

Показано, что однократное добавление TNF α приводило к увеличению экспрессии IL1 β уже через сутки в 20–560 раз. Повышенный уровень экспрессии IL1 β сохранялся на протяжении 4 суток после пульсовой активации ММСК. Многократное добавление TNF α к ММСК приводило к увеличению суммарной клеточной продукции в 7–65 раз в зависимости от донора. Это сопровождалось стабильно и существенно повышенным уровнем экспрессии IL1 β в 60–170 раз в зависимости от образца ММСК. Отмена TNF α приводила к снижению экспрессии IL1 β . Полученные результаты демонстрируют, что активация ММСК наряду с увеличением продукции иммунорегуляторных молекул вызывает повышение провоспалительных цитокинов, в частности IL1 β , что следует принимать во внимание при использовании этих клеток в клеточной терапии. Степень индукции экспрессии IL1 β в ММСК зависит от донора клеток. Индивидуальные различия в способности ММСК активироваться и экспрессировать различные молекулы, в том числе и IL1 β , могут обуславливать различия в эффективности их применения.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 19-29-04023.

bFGF ПОВЫШАЕТ УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В ФИБРОБЛАСТАХ

Наталья Николаевна Дремина¹, Ирина Сергеевна Трухан¹, Михаил Геннадьевич Шурыгин¹, Ирина Александровна Шурыгина^{1,2}

¹ *ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия;*

² *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

shurygina@rambler.ru

Известно, что основной фактор роста фибробластов (FGF) является модулятором дифференцировки и пролиферации клеток, в частности, фибробластов.

Окислительное фосфорилирование (OxPhos) у млекопитающих обеспечивает более чем 90% энергии клетки, имеет важное значение для функционирования клеток и их выживания. Цитохром С и цитохром С оксидаза представляют терминальное звено электрон-транспортной цепи.

Цель исследования: определить влияние bFGF на окислительное фосфорилирование в фибробластах.

Материал и методы. Эксперимент проведен на первичной культуре фибробластов, выделенной из сальника крысы линии Wistar. К клеткам 3 пассажа добавляли bFGF в дозе 133 пг/мл. Проводили прижизненное наблюдение за морфологией клеточной культуры в течение суток при помощи BioStationCT Cell Culture Observation System Ver. 4.1 NIKON. Через сутки клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием первичных антител anti-OxPhos Complex IV subunit I (Invitrogen).

Заключение. Установлено, что стимуляция культуры фибробластов при помощи bFGF приводит к изменению морфологии фибробластов, их откреплению от основы, повышению уровня окислительного фосфорилирования в фибробластах.

ПРИНЦИП ПОЛИКЛОНАЛЬНОСТИ В КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЕ

Нина Иосифовна Дризе

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

ndrize@yandex.ru

Посвящается памяти Иосифа Львовича Черткова.

Кровь связывает воедино все органы и ткани многоклеточного организма, снабжает их питательными веществами и кислородом, отводит углекислый газ и продукты обмена, поддерживает гомеостаз и обеспечивает защиту от инфекций. Кроветворная система, функционирование которой во взрослом организме обеспечивается двумя стволовыми клетками — стволовыми кроветворными клетками (СКК) и мезенхимными стволовыми клетками (МСК), производит 300 миллионов клеток за 1 мин. у. Такая огромная клеточная продукция требует жесткой регуляции — клетки должны вовремя дифференцироваться во все 10 линий кроветворных клеток и вовремя погибнуть. Клеточная продукция поддерживается одновременным функционированием множества клонов СКК. Клоны СКК сменяют друг друга. Такое устройство системы позволяет избежать лимита пролиферации Хейфлика. С возрастом поликлональный состав меняется, и начинают выявляться

доминирующие клоны, число которых возрастает у человека после 60 лет. Если жить долго, то поликлональный гемопозз заменяется на олигоклональный у людей после 90 лет, и даже описан случай моноклонального поддержания кроветворения в 115 лет.

Регуляция кроветворения осуществляется стромальными клетками костного мозга — потомками МСК. Стромальные клетки образуют функциональные ниши для СКК, где локально регулируется их состояние покоя, пролиферация и дифференцировка. СКК очень много в организме, разумно предполагать, что и ниш для них должно быть много. МСК, дифференцирующиеся в клетки ниши, располагаются локально в специфических участках костного мозга. Выделяют остеобластную и сосудистую ниши. МСК практически не мигрирующие клетки и можно было полагать, что их исходно должно быть примерно столько же, сколько СКК. С возрастом ниши «портятся» — плохо удерживают СКК в состоянии покоя. СКК «считают митозы», находясь в нише, и начинают более активно пролиферировать (у пожилых людей и мышей количество СКК сильно увеличивается). Получены первые результаты о том, что популяция МСК аналогично СКК поликлональна. МСК дифференцируются во все мезенхимные дифференцировки по мере запроса. Вероятно одновременно функционирует только определенная часть МСК, а затем с возрастом количество заложенных в онтогенезе МСК истощается.

Таким образом, в организме поддерживается принцип поликлональности кроветворной системы, который обеспечивает огромную клеточную продукцию и защиту организма от многочисленных мутаций, возникающих в активно пролиферирующих клетках.

ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ КРЫС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПИЩЕВОГО ХОЛИНА

Татьяна Клеониковна Дубовая¹, Мария Владиславовна Гусева², Андрей Александрович Каменский²

¹ Кафедра гистологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет, Москва, Россия;

² Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

auts77@gmail.com

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) относится к наиболее распространенным видам травматической патологии и является одной из главных причин инвалидизации и смертности населения. Репаративные процессы при ЧМТ представлены каскадом структурных, метаболических, клеточных и молекулярных нарушений, сопровождающихся деструктивными изменениями (нейровоспалением, эксайтотоксичностью, нейродегенерацией) и репаративными. Последние обеспечиваются нейро-, глио-, ангио- и синаптогенезом. Их взаимодействие лежит в основе регенеративных процессов в мозге при его повреждении, в том числе, травматическом. Для полноценного восстановления при ЧМТ, как правило, применяется медикаментозная терапия с использованием современных нейропротекторов. В настоящее время весьма перспективными являются препараты, содержащие холин.

Цель исследования — оценить влияние различных доз пищевого холина на морфологическое

и функциональное состояние головного мозга после его контузии. Эксперименты проводились на молодых крысах-самцах породы Спрейг Доули. Схема эксперимента: анестезия 2% изофлураном → крапнеотомия → удар специальным электронно-контролируемым стержнем. Контролем служили ложнопериоперированные животные, подвергавшиеся только анестезии и крапнеотомии. Крысы получали холин с пищей в виде стандартной диеты (0,2% холина) или в виде холин-избыточной диеты (2% холина) в течение 14 суток до и 12 суток после травмы и ложной операции, после чего их выводили из опыта.

Методы исследования. Гистологические (окраска по Нисслю), морфометрические (определение относительного объема сохраненной ткани коры головного мозга), метод автордиографии (определение степени экспрессии $\alpha 7$ nAChR и бензодиазепиновых рецепторов; последний показатель косвенно свидетельствует о выраженности нейровоспалительного процесса), оценка когнитивных функций (пространственной памяти с использованием водного лабиринта Морриса).

Результаты. Применение именно повышенных доз холина приводит к оптимизации восстановительного процесса при ЧМТ. У травмированных крыс увеличивается количество сохраненной ткани коры, возрастает плотность $\alpha 7$ nAChR, частично восстанавливается когнитивная функция мозга, снижается интенсивность воспаления за счет ослабления активности микроглии.

ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА В КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЕ С ИМПЛАНТИРУЕМОЙ БИОПОЛИМЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И АЛЬГИНАТА

Андрей Андреевич Дудун¹, Елизавета Александровна Акулина², Татьяна Константиновна Махина¹, Антон Павлович Бонарцев², Вера Владимировна Воинова², Гарина Александровна Бонарцева¹

¹ ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;

² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

dudunandrey@mail.ru

Биополимерные конструкции получили широкое применение в тканевой инженерии, в частности исследовано их использование для регенерации костной, мышечной, эпителиальной и других тканей [1]. Особый интерес занимают исследования в области регенерации толстого кишечника, так как именно с этим отделом связаны такие заболевания как болезнь Крона, колит, рак толстой кишки. Основная особенность кишечника — это плотное симбиотическое взаимоотношение со сложным бактериальным сообществом и любой фактор или воздействие на желудочно-кишечный тракт существенно изменяет состав микробиоты. Тем самым состав микробиоты может играть роль маркера при имплантации 3-мерного полимерного изделия. Целью работы была оценка изменения кишечной микробиоты после имплантации биополимерной конструкции в толстый кишечник крысам линии Вистар.

Биополимеры поли-3-оксибутират (ПОБ) и альгинат были получены бактериальным синтезом при помощи культивирования бактериального штамма *Azotobacter*

agile 12. Бактерии для синтеза ПОБ выращивали на жидкой среде Берка при минимальном уровне азотации, для синтеза альгината — при максимальном. Выделение биополимеров из биомассы проводили после 48 ч культивирования.

Имплантируемая композитная конструкция состояла из пористой подложки на основе ПОБ в виде трубки длиной 2 см и диаметром 0,5 см, покрытой альгинатным гидрогелем. Конструкция была имплантирована крысам породы Вистар в область толстого кишечника. Через неделю было проведено вскрытие крыс и отбора биоматериала для метагеномного анализа.

Метагеномный анализ был проведен по гипервариабельному участку V4 гена 16S рРНК. ДНК амплифицировали праймерами F515 (GTGBCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Секвенирование было проведено на секвенаторе Illumina MiSeq. Обработка прочтений и анализ данных были проведены в программе QIIME. Анализ данных показал, что в дооперационных и послеоперационных образцах преобладали бактерии филума Firmicutes. Значимые количественные различия найдены на уровне рода — в опытных образцах проявляются вспышки 3 родов бактерий: *Ileibacterium*, *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* и представителя *Christensenellaceae*; и наблюдается резкое уменьшение вплоть до исчезновения доли бактерий рода *Erysipelatoclostridium*.

Работа была поддержана Российским научным фондом, проект № 17-74-20104.

Литература:

1. Bonartsev A.P. et. al. Application of polyhydroxyalkanoates in medicine and the biological activity of natural poly(3-hydroxybutyrate). *Acta Naturae* 2019; 11(41): 4–16.

ОСОБЕННОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕПТИНУ ЛОКАЛЬНЫХ ЖИРОВЫХ ДЕПО У ПАЦИЕНТОВ С ИБС И ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Юлия Александровна Дылева¹, Дарья Андреевна Бородкина^{1,3}, Ольга Викторовна Груздева^{1,2}, Екатерина Владимировна Белик¹

¹ Лаборатория исследования гомеостаза ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия;

² Кафедра медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Россия;

³ Областной диабетологический центр Кемеровской области, «Кемеровская областная клиническая больница» им. С.В. Беяева, Кемерово, Россия

dyleva87@yandex.ru

Цель работы: определить особенности продукции лептина и его рецептора в подкожных, эпикардиальных и периваскулярных адипоцитах у пациентов с ишемической болезнью сердца и пороками сердца.

Материалы и методы. В исследование включено 84 пациента с ишемической болезнью сердца и инфарктом миокарда в анамнезе и 50 пациентов с пороками сердца: 30 человек с врожденными пороками сердца (недостаточность аортального клапана) и 20 с приобретенными пороками сердца (на фоне ревматической болезни сердца, стеноз митрального клапана). Всем пациентам во время планового оперативного

вмешательства (аортокоронарного шунтирования или замены клапанов сердца), проводился забор адипоцитов эпикардиальной (ЭЖТ) и подкожной жировой ткани (ПЖТ) и периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) (в области маммакоронарного сосудистого пучка, который располагается в переднем средостении — восходящей частью аорты) с последующим культивированием и получением супернатанта. В супернатанте определения экспрессии генов лептина и его растворимого рецептора (SOB-R), а также содержания продуктов его экспрессии методом иммуноферментного анализа использовались тест-системы фирмы BioVendor (США). Расчет индекса свободного лептина (FLI) определяли по формуле: лептин/ SOB-R*100. Данные проанализированы с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 9.0.

Результаты. Установлено, что «метаболический» потенциал жировой ткани зависит от ее локализации. ЭЖТ характеризовалась более высокой экспрессией гена лептина по сравнению с ПЖТ. ЭЖТ независимо от нозологии заболевания характеризовались самой высокой концентрацией лептина в супернатанте. Адипоциты ПВЖТ, напротив, характеризовались наиболее низкой экспрессией гена лептина и содержанием его в супернатанте по сравнению с другими клеточными культурами. Так уровень мРНК гена лептина был в 2,1 раза выше в культуре эпикардиальных адипоцитов по сравнению с подкожными. Несмотря на это существенной разницы в концентрации самого лептина в супернатанте исследуемых культур найдено не было. Для ПВЖТ, было характерно самое высокое содержание мРНК и SOB-R, а также самый низкий FLI. Причем у пациентов с пороками сердца экспрессия мРНК SOB-R была в 1,58 раза интенсивнее, чем у пациентов с ИБС, хотя содержание самого рецептора в супернатанте достоверно не различалось.

Вывод. Таким образом, наличие ИБС формирует лептинорезистентности, особенно в ЭЖТ.

ГОМЕОБОКСНЫЙ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ NHEX — НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР АДИПОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ.

Мария Николаевна Евсеева², Данияр Таалайбекович Дыйканов¹, Максим Николаевич Карагаур¹, Юрий Петрович Рубцов², Константин Юрьевич Кулебякин¹

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

mr.urfin-juice@yandex.ru

Ожирение является одной из наиболее распространенных проблем современной медицины и сопряжено с высоким риском развития сахарного диабета 2 типа и других патологий. В основе ожирения лежит нарушение процесса адипогенеза. К настоящему моменту молекулярные механизмы адипогенеза изучены недостаточно, а применение лекарственных препаратов (агонисты PPAR γ тиазолидиндионы), действующих на уже установленные регуляторы, сопряжено с возникновением множества побочных эффектов (*JAMA Intern. Med.* 2017 May 1;177(5)). Уточнение сигнальных каскадов и детальное изучение механизмов регуляции адипогенеза позволит создать препараты направленного действия с меньшим количеством побочных эффектов.

Недавно методом полногеномного исследования ассоциаций (GWAS) было обнаружено, что полиморфизмы в гене HHEX сопряжены с развитием диабета 2 типа и высоким индексом массы тела при рождении (World J. Diabetes. 2014 Apr 15; 5(2)). В данной работе исследована функция фактора транскрипции Hhex в регуляции адипогенеза в клеточной культуре мышинных преадипоцитов 3T3L1.

Результаты.

1. Нокдаун Hhex приводит к дозозависимому подавлению адипогенеза.

Для создания нокдауна клетки 3T3L1 трансфицировали siRNA к Hhex. Уменьшение количества белка оценивали с помощью иммуноблоттинга. siRNA, максимально подавляющие Hhex, были использованы для уменьшения количества Hhex в клетках 3T3L1 в процессе дифференцировки в адипоциты. В качестве контролей использовали клетки, трансфицированные олигонуклеотидом к мРНК люциферазы. Адипоцитарную дифференцировку индуцировали добавлением инсулина 1 мкг/мл, изобутилметилксантина 0,5 mM, дексаметазона 0,25 мкМ. Установили, что Hhex дозозависимо подавляет адипогенез в клетках 3T3L1.

2. Уровень белка и мРНК Hhex максимальны в первые 24 часа от начала адипоцитарной дифференцировки.

Для уточнения момента активации гена Hhex в ходе адипогенеза исследовали изменение уровня белка и мРНК Hhex через 24 ч, 30 ч, 36 ч, 48 ч, 72 ч с момента индукции адипогенеза. Достоверно показано, что уровни белка и мРНК Hhex максимальны через 24 часа с момента индукции адипогенеза.

Обсуждение. Мы показали, что Hhex дозозависимо подавляет адипогенез, действуя, по всей видимости, на ранних этапах дифференцировки, о чём свидетельствует кинетика уровней мРНК и белка. Возможно, Hhex участвует в индукции сигнальных каскадов, активных в момент наступления конфлюентности клеток (первые 24–48 часов адипогенеза).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00530.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШИРОКОПОЛЬНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК С МАТРИЦАМИ-НОСИТЕЛЯМИ НА ЭТАПЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ IN VITRO

Марфа Николаевна Егорихина, Диана Яковлевна Алейник, Ирина Николаевна Чарыкова, Юлия Павловна Рубцова

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

egorihina.marfa@yandex.ru

При разработке биомедицинских клеточных продуктов и тканеинженерных конструкций особое внимание уделяется оценке взаимодействия материала (матрицы-носителя, скаффолда и т.д.) с клетками. Не вызывает сомнения, что материалы играют ключевую роль, обеспечивая успешные клеточные события и интеграцию конструкции в организм пациента. Одним из наиболее остро стоящих вопросов на этапах разработки материала и доклинических исследований in vitro является оценка его взаимодействия с клетками. Большинство наиболее распространенных методик, используемых для

оценки цитотоксичности материала и функциональной активности клеток при взаимодействии с материалом, представлены косвенными методами, не позволяющими провести прямую комплексную оценку основных необходимых характеристик.

Цель. Оценить возможности использования широкопольной флуоресцентной микроскопии для характеристики взаимодействия поверхности зависимых клеток с матрицами-носителями на этапе доклинических исследований in vitro

Материалы и методы. Клеточный материал — мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека (3–4 пассаж; жизнеспособность 98–99%, иммунофенотип характерен для МСК). Для оценки взаимодействия клеток с образцами материала использовали методы широкопольной флуоресцентной микроскопии, реализуемые на имиджере Cytation 5 (BioTek, США), реализованное окрашивание клеток проводили с использованием флуорохромов Hoechst 3334 (США), Calcein AM (США), Lipophilic Tracers-DiO DiOC14(3) Hydroxyethanesulfonate (США), TO-PRO™3 Ready Flow™ Reagent (США).

Результаты. Комплексная оценка взаимодействия МСК с материалами, различающимися по составу и физико-химическим характеристикам (сплавы титана, синтетические полимерные материалы, биополимерные материалы, материалы на основе депротенизированной костной ткани), показала, что цитотоксичность материала и его адгезионные свойства в отношении поверхностно зависимых клеток, характеристика жизнеспособности, морфологии и пролиферативной активности клеток при взаимодействии с материалом могут быть оценены с помощью клеточного имиджинга, реализуемого методом широкопольной флуоресцентной микроскопии. Использование широкопольной флуоресцентной микроскопии при исследовании пористых полимерных матриц-носителей позволяет оценить распределение клеток относительно структуры материала и миграционную активность клеток. Разработан способ количественной оценки клеток, распределенных в структуре скаффолдов (Пат. РФ № 2675376...от 17.07.2017).

МОДИФИКАЦИЯ БРУШИТОВЫХ ЦЕМЕНТОВ МОЛОЧНОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТОЙ

Алексей Александрович Егоров, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев
ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

alex1814@yandex.ru

Кальцийфосфатные цементы (КФЦ) нашли широкое практическое применение в костной хирургии и предназначены для заполнения дефектов костных тканей. Данные материалы должны обладать комплексом свойств, таких как биосовместимость, остеокондуктивность и скорость биодеградации, последняя согласована с процессами остеогенеза. К достоинствам этих материалов можно отнести: во-первых, их способность заполнять дефекты самой сложной конфигурации и объема; во-вторых, малую инвазивность вмешательств, т.е. возможность введения данных материалов в инъекционной форме непосредственно в зону дефекта под контролем УЗИ или рентгена, без обширных оперативных вмешательств и возможность 3D-фиксации. Основными недостатками КФЦ являются плохие механические свойства и поэтому может использоваться только в сочетании

с металлическими имплантатами или в местах не несущих нагрузку. Трикальцийфосфат (α -ТКФ, α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) является одним из основных компонентов для приготовления КФЦ среди многочисленных составов. Реакция гидратации α -ТКФ осуществляется путем его быстрого растворения и последовательного осаждения менее растворимой фазы. Продуктами гидратации α -ТКФ являются дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД, брусит, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), октакальцийфосфат (ОКФ, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) или кальцийдефицитный гидроксипатит в зависимости от различных условий реакции.

Цель исследования — изучение фазового состава и морфологии кальцийфосфатных цементов на основе брусита с введенными в них карбоновых кислот таких как: молочная и янтарная кислота.

В ходе выполнения исследования были разработаны КФЦ модифицированные карбоновыми кислотами таких как: молочная и янтарная кислота. Изучена кинетика схватывания и твердения, формирования микроstructures и фазообразования. Проведена оптимизация материалов по составу, микроstructure, свойствам и полимерной составляющей. Установлено, что оптимальный состав по микроstructure и свойствам содержит до 10 масс. % молочной кислоты с прочностью при сжатии до 20 МПа, а для янтарной кислоты 25 МПа при выдержке их в растворе SBF (simulated body fluid) в течение 28 суток.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-33-20258 мол_а_вед). Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075–00746–19–00.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКРОПТОЗА, АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА ПРИ МИТОТИЧЕСКОЙ КАТАСТРОФЕ

Александра Юрьевна Егоршина¹, Алексей Владимирович Замараев¹, Борис Давидович Животовский^{1,2}, Гелина Сергеевна Копейна¹

¹ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

egorshina.aleksandra.2012@post.bio.msu.ru

Митотическая катастрофа — это состояние клетки, которое вызывается нарушениями в митозе, такими как грубые хромосомные aberrации или дефекты митотического веретена деления. Митотическая катастрофа представляет собой один из механизмов подавления формирования и роста опухолей, а также успешно используется в клинической практике, как стратегия лечения онкологических заболеваний. События, следующие за митотической катастрофой, напрямую зависят от баланса между белками, регулирующими пути гибели клеток. Таким образом, митотическая катастрофа может привести к апоптотической, некротической и аутофагической гибели клеток. В настоящее время механизм некротической гибели клеток, вызываемой митотической катастрофой, остается неизвестным.

В данной работе митотическая катастрофа была индуцирована в клеточных линиях карциномы яичника (Caov-4) и колоректального рака (HCT116 wt и HCT116 p53-/-) с использованием химиотерапевтических препаратов в низких концентрациях, таких как доксорубин (600 нМ), повреждающий ДНК,

и колцемид (10 мкг/мл), деполимеризующий микро-трубочки. Вестерн-блот анализ продемонстрировал увеличение фосфорилирования некротических эффекторов MLKL и RIP-1 после обработки клеток доксорубином или колцемидом в течение 48 часов. В этих условиях в клеточных линиях Caov-4 и HCT116 детектировалось формирование комплекса RIPoptosome, обеспечивающего активацию RIP-1. Необходимо отметить, что клетки HCT116 p53-/- были более склонны к фосфорилированию RIP-1 и, соответственно, последующему некроптозу. Ингибирование некроптоза с использованием некростатина-1s повышало уровень апоптотической гибели клеток в HCT116 wt, а блокировка некроптоза в отсутствие p53 (HCT116 p53-/-) приводила к повышению уровня аутофагии. Однако, ингибирование аутофагии с использованием бафиломицина А1 не стимулировало RIP-1-зависимый некроптоз, а усилило апоптоз.

Согласно полученным данным, митотическая катастрофа, помимо апоптоза и аутофагии, приводит к RIP-1-зависимому некроптозу при обработке колцемидом или доксорубином клеток Caov-4 и HCT116. При этом взаимосвязь между апоптозом, RIP-1-зависимым некроптозом и аутофагией регулируется p53.

Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00211).

ДИНАМИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТЕОКОММИТИРОВАНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНО-НЕАКТИВНЫХ МСК В УСЛОВИЯХ ТКАНЕВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА

Мария Игоревна Ездакова, Екатерина Андреевна Голикова, Ирина Вячеславовна Адриановна, Елена Ромуальдовна Андреева, Людмила Борисовна Буравкова

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

ezdakova.mi@gmail.com

В настоящее время перспективным инструментом в регенеративной клеточной терапии выступают мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК). В первую очередь это обусловлено высокой функциональной активностью. МСК принимают участие в формировании гемопоэтической тканевой ниши, что используется для строма-зависимой экспансии гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) *in vitro*. Предварительная модификация МСК с учетом свойств ниши может улучшить их стромальные свойства. Ранее мы показали, что при тканевом уровне O_2 («физиологическая» гипоксия) улучшается экспансия ГСК. Особый интерес вызывают немногочисленные работы показавшие, что ранние остеопрогениторы, сохранившие бипотентный остеодипо-дифференцировочный потенциал, обладают более высокой гемопоэз-поддерживающей активностью. В настоящей работе проведен анализ временной динамики изменения экспрессии генов, характерных для остео- и адиподифференцировки при остеоиндукции с целью определения оптимального времени, когда остеокоммитированные МСК сохраняют бипотентный потенциал в условиях «физиологической» гипоксии.

В экспериментах использовали МСК из жировой ткани человека постоянно культивируемые при 5% O_2 . Для определения временной динамики индуцированного остеокоммитирования МСК, был проведен

количественный ПЦР анализ активности генов, продукты которых участвуют в регуляции остеогенной и адипогенной дифференцировки на 3,7 и 14 день индукции. Результаты дифференцировки клеток в остеогенном направлении оценивали по активности щелочной фосфатазы и минерализации внеклеточного матрикса.

Оценка изменения экспрессии остео-генов выявила повышение *ALPL*, что было подтверждено и увеличением самого продукта (3–7 сутки), указывая на начало остеоидифференцировки. Экспрессии генов-регуляторов раннего остеогенеза (*RUNX2*, *SP7*) не изменялась. В МСК в ходе культивирования увеличивалась экспрессия генов, ответственных за позднюю остеоидифференцировку (*SPARC*, *SPP1*). Анализ данных по динамике экспрессии адипо-генов показал повышение транскрипционной активности (*PPARG* и *FOS*) при увеличении длительности культивирования (7–14 сутки).

Результаты экспериментов показали, что наиболее оптимальная временная экспозиция для дальнейших экспериментов составляет с 3 по 7 сутки, поскольку именно в этот промежуток времени клетки характеризуются бипотентным остео-адипо-дифференцировочным потенциалом.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН № 18.

ОРГАНЫ НА ЧИПЕ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ТРАДИЦИОННЫМ МОДЕЛЯМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ЖИВОТНЫХ

Юлия Игоревна Елисеева

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

julia.eliseeva@mail.ru

Для изучения механизмов возникновения различных заболеваний, а также для разработки и тестирования лекарственных препаратов необходима удобная и современная модельная система. Существующие стандартные модели клеточных культур слишком примитивны и не позволяют рассмотреть все особенности человеческого организма и появление возможных побочных реакций, а модели животных не являются достаточно достоверными при экстраполяции полученных результатов на человека. Потенциально такой платформой для экспериментов могут стать «органы на чипе», представляющие собой микрофлюидные устройства, способные физиологически релевантно имитировать различные органы и ткани человека.

В данных устройствах используются непосредственно человеческие клетки, которые способны воспроизвести метаболизм человека. При правильном эксперименте могут быть сделаны точные предсказания эффективных и токсических концентраций. Такие устройства более экономичны и позволяют проводить тестирование комбинаций соединений в различных концентрациях, благодаря их параллельной работе.

Несмотря на все преимущества моделей органов-на-чипе они еще имеют ряд недостатков, которые необходимо преодолеть перед их широкомасштабным применением и заменой стандартных методов исследований. Но есть все основания полагать, что после дальнейшей оптимизации и стандартизации, модели «органов на чипе» смогут быть включены в процесс разработки лекарств.

В будущем технологии «органов на чипе» могут использоваться для улучшения промышленного развития

и персонализированной медицины, а также найти свое применение в биотехнологических, фармацевтических, косметических и химических компаниях.

В данной работе рассмотрены некоторые уже созданные «органы на чипе» — почки, сердца, кожи, мозга, легких, печени, кишечника, глаза, плаценты и костного мозга. А также — микрофлюидные устройства «опухолей на чипе», позволяющие лучше изучить механизмы возникновения онкологических заболеваний, а также применять персонализированное лечение пациентов, используя их собственные клетки и ткани в моделировании болезней.

Кроме того, уделено внимание разработке «органа на чипе», позволяющего проводить более точные исследования нормального и патологического состояния органов, взаимодействий между ними, а кроме того предсказывать возможные побочные эффекты от терапии на соседние органы и ткани. Данная система имеет высокий потенциал, чтобы заменить традиционные модели клеточных культур и животных и стать удобной альтернативой для использования учеными повсеместно.

МАКРОФАГИ — ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Андрей Владимирович Ельчанинов¹, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова», Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

tfat@yandex.ru

Одним из наиболее активно развивающихся направлений регенеративной медицины являются клеточные технологии. С точки зрения участия в репарации макрофаги рассматриваются как перспективный клеточный продукт и как терапевтическая мишень для стимуляции регенерации.

С точки зрения функциональных свойств различают M1-макрофаги, обладающие провоспалительными свойствами, и M2, способствующие разрешению воспаления (Martinez, Gordon, 2014). Локальное смещение баланса M1/M2 типов макрофагов в сторону M2 улучшает динамику и эффективность репаративных процессов, что продемонстрировано на моделях кожной раны (Okizaki, 2015), повреждения спинного мозга (Nakajima, 2012), инфаркта миокарда (Singla, 2015) и др.

Несмотря на полученные данные, остается непонятным, макрофаги из каких источников более активны в отношении стимуляции регенерации. Различают популяцию самоподдерживающихся резидентных макрофагов (микроглия, клетки Купффера и др.), развивающиеся из гемопоэтических клеток желточного мешка, а также макрофаги, которые являются производными моноцитов, развивающихся в красном костном мозге (Hoeffel and Ginhoux, 2018). Предполагается, что резидентные макрофаги имеют фенотип близкий к M2-типу, а макрофаги, развивающиеся из моноцитов — к M1-фенотипу (Beattie et al., 2016).

Нами установлено, что в моноцитарных макрофагах при стимуляции активируется экспрессия как про-, так и противовоспалительных цитокинов (Lokhonina et al., 2019). При этом моноцитарные макрофаги в целом

являются более чувствительными к факторам активации (Лохонина и соавт., 2019). Моноциты и клетки Купфера по данным NanoString имеют разный профиль экспрессии генов, связанных с воспалением. Однако обнаруженная разница не позволяет отнести резидентные макрофаги печени к M2-макрофагам, а моноциты к клеткам с M1-фенотипом. При этом у моноцитов обнаружена повышенная экспрессия генов Toll-подобных рецепторов *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr7*, *Tlr8*, что согласуется с ранее установленным фактом большей чувствительности моноцитарных макрофагов к факторам активации.

Таким образом, учитывая легкость получения и выращенную фенотипическую пластичность, наиболее перспективными для использования в регенеративной медицине являются макрофаги костномозгового (моноцитарного) происхождения.

Исследование выполнено при поддержке РФФ (номер проекта 17-15-01419), а также Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук (номер проекта 075-15-2019-1120).

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ C2C12 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ИНДУКЦИОННЫХ СРЕД IN VITRO

Алексей Михайлович Емелин¹, Денис Олегович Бувев¹, Александра Алексеевна Слабикова¹, Иван Антонович Яковлев^{2,3}, Роман Вадимович Деев^{2,4}

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Россия;

² Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

buev_denis@mail.ru

Наследственные миодистрофии — группа заболеваний, характеризующаяся прогрессирующим поражением мышц, инвалидизацией и, в большинстве случаев, гибелью больного в трудоспособном возрасте. Потенциальным подходом к лечению рассматривается генная терапия, в которой в качестве вектора будут использоваться клетки миогенных линий с отредактированным геномом. Ключевым событием доставки терапевтического гена в поврежденные клетки является феномен клеточного слияния. Разработка методов индукции этого процесса может повысить эффективность самого лечения. Одним из искусственных индукторов слияния клеток является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Цель эксперимента — воссоздать дифференцировку клеточной линии C2C12 *in vitro*, используя индукционную среду, с предварительной обработкой клеток ПЭГ и без нее, оценить индекс клеточного слияния.

В работе использовали линию иммортализованных миобластов мыши — C2C12. Изначально, клеточная линия культивировалась с использованием стандартной ростовой среды DMEM F12, 20% телячьей сыворотки (FBS) с добавлением фактора роста фибробластов и антибиотика. После достижения конfluence, клетки пересеивались на 12-луночный планшет в количестве 8×10^4 на лунку. Предварительную обработку

ПЭГ 1450 производили путем ресуспендирования преципитата клеток в 1 мл 50% р-ра ПЭГ с DMEM F12 в течение 90 с. с последующей очисткой от ПЭГ центрифугированием. На следующий день переводили культуры на индукционную среду DMEM HG, 2% FBS со сменой среды раз в 3 дня. Наблюдение и фотофиксацию осуществляли на увеличении $\times 200$ с интервалом в 24 часа, с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа на протяжении 10 дней после внесения индукционной среды. После фиксации, в образовавшихся многоядерных структурах была с помощью РИФ детектирована экспрессия Миогенина (MyoG), дисферлина, α -гладкомышечного актина, из чего следует атрибутировать многоядерные клеточные структуры как формирующиеся мышечные трубочки (миотубы). Клетки, обработанные ПЭГом, погибали и откреплялись на 3 сутки эксперимента, снижая конfluence до 20–30%.

С помощью оригинальной формулы (Рационализаторское предложение № 1393, РязГМУ) был рассчитан индекс клеточного слияния (I) в день внесения индукционной среды, спустя 2 и 10 суток. Без обработки ПЭГ: $5,94 \pm 2,87$; $3,83 \pm 1,3$; $37,23 \pm 14,33$ соответственно. С обработкой ПЭГ: $28,56 \pm 11,49$; $19,57 \pm 10,59$; 0 соответственно. Можно сделать вывод, что полученные в результате ПЭГ-опосредованного слияния многоядерные клетки имеют низкую выживаемость.

ОЦЕНКА НЕЙРОГИСТОГЕНЕЗА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ В СОСТАВЕ ОРГАНОИДОВ МОЗГА

Алексей Емелин¹, Лиля Шувалова², Александра Слабикова¹, Денис Бувев¹, Екатерина Козырева¹, О. Лебедева², Артем Еремеев², Роман Деев³

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

² Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины, лаборатория клеточной биологии, Москва, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Eamar4Orn@gmail.com

Оценка элементов гистогенеза в модельных системах *in vitro* при культивировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) является новой актуальной задачей гистологии. Современным методом работы в этом направлении является 3D культивирование в составе сфероидов (флотирующих клеточных агрегатов), позволяющее воспроизводить объемные процессы гистогенеза и моделировать условия, приближенные к состоянию *in vivo*.

иПСК были выделены как от здоровых доноров — добровольцев, так и от доноров с нейродегенеративными заболеваниями (Болезнь Хантингтона, спиноцереbellарная атаксия). Культивирование иПСК и дифференцировка в органоиды проводилось по протоколу (Еремеев и др., 2019 г) в лаборатории клеточной биологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины (Москва, зав. М.А. Лагарькова). В работе применены рутинные гистологические методы (гематоксилин и эозин), иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные методы, трансмиссионная электронная микроскопия.

Полученные нейросферы были разделены на две группы: 1 (диаметр > 900 мкм), 2 (диаметр < 900 мкм). В 1 группе отмечена гибель клеток центральной части сфероидов и сохранение жизнеспособности клеток в периферической зоне. Ki67⁺ клетки преобладали в кортикальном отделе 1 группы, и были распределены диффузно в образцах из 2 групп. Выявлено формирование примитивных нервных трубок — «розеток», сформированных медулобластами или эпендимоподобными клетками, между которыми выявлены плотные межклеточные контакты.

Во всех нейросферах детектированы клетки, содержащие нейронспецифические маркеры β -III-tubulin и MAP2; ChAT (маркер холинергических нейронов); GFAP (маркер нейроглии); SOX1 (маркер ранних клеточных предшественников).

Наибольшая плотность GFAP⁺ клеток отмечена в кортикальном отделе (некоторые SOX1⁺), β -III-tubulin⁺ — в субкортикальных отделах нейросфер. Для 2 группы характерно диффузное равномерное распределение перечисленных маркеров, с преобладанием GFAP⁺ клеток в периферической части.

Таким образом, в модельных условиях 3D культивирования *in vitro* показана возможность пролиферации и дивергентной нейро- и глиоцитарной дифференцировки. Гибель клеток центральной части крупных сфероидов наиболее вероятно связана с метаболическим дефицитом в этой области, что может являться объективным ограничением использованной модели.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Илья Игоревич Еремин¹, Иван Николаевич Корсаков², Анастасия Петровна Петрикина², Татьяна Сергеевна Чаузова², Ольга Сергеевна Гринаковская², Галия Равилевна Сетдикова³, Оксана Владимировна Паклина³, Андрей Алексеевич Пулин¹

¹ Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² Лаборатория клеточной биологии и патологии развития, ФГБНУ «НИИОПП», Москва, Россия;

³ Патологоанатомическое отделение ГБУЗ ГKB им. С.П. Боткина ДЗМ, Москва, Россия

cd105@mail.ru

Сегодня в регенеративной медицине используется широкий спектр клеточных продуктов, содержащих разные типы клеток, полученные из различных источников. При этом, каждый из источников обладает своими преимуществами и недостатками. Сравнительные исследования клеток, выделенных из различных источников, их концентраций и кратности введения на одной модели практически отсутствуют.

Цель работы — сравнительный анализ терапевтической эффективности клеточных продуктов, содержащих различные клетки, в условиях одной экспериментальной модели.

В качестве модели нами была выбрана модель термического ожога кожи крысы.

Животные (крысы Wistar, массой тела 200–250 г) были разделены на 16 групп по 12 животных в каждой. В качестве клеточных продуктов были использованы: стромально-васкулярная фракция жировой ткани (СВФ),

выделенная из 1 мл жира, СВФ из 1 мл жира, обогащенная культивированными аутологичными мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани (МСК ЖТ) (5 или 10 млн клеток), СВФ из 1 мл жира, обогащенная аллогенными МСК ЖТ (1, 5 или 10 млн клеток), аутологичные МСК ЖТ (1, 5 или 10 млн клеток), аллогенные МСК ЖТ (5 млн клеток), аллогенные МСК, выделенные из плаценты (однократная инъекция 5 млн клеток или двукратная инъекция по 5 млн клеток с интервалом в неделю), аллогенные МСК, выделенные из слизистой оболочки полости рта (1 или 5 млн клеток). Исследуемый продукт ресуспендировали в 0,6 мл физиологического раствора и вводили равными порциями подкожно в 24 точках по окружности и под дно раны через 8 проколов на третьи сутки после моделирования ожога и на 10 сутки (в случае двукратного введения). Животным в контрольной группе вводили аналогичный объем физиологического раствора.

Основным критерием эффективности являлось время до полной эпителизации раны (в сутках). Дополнительными критериями эффективности были — уменьшение площади кожной раны на 21 и 30 сутки и степень регенерации по данным гистологического исследования.

В результате были получены данные, свидетельствующие в пользу большей терапевтической эффективности аллогенных МСК, выделенных из плаценты по сравнению со всеми другими видами клеток. При этом двукратное введение плацентарных МСК было более эффективным по сравнению с однократным. Таким образом, по результатам проведенного эксперимента, можно считать, что плацента является наиболее перспективным источником для получения аллогенных клеточных продуктов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).

СТАТУС СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА В СОВРЕМЕННЫХ РЕАЛИЯХ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРАВОВОГО ПОЛЯ

Илья Игоревич Еремин¹, Ирина Ивановна Наделяева¹, Вячеслав Сергеевич Васильев²

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия

cd105@mail.ru

Современная регенеративная медицина в числе своих основных инструментов имеет значительное число клеточных продуктов. В условиях текущих реалий отечественного правового поля, существует ситуация, когда часть продуктов для клеточной терапии не подпадает под правовое регулирование. Основная причина — отсутствие какой-либо классификации клеточных продуктов, закрепленной в нормативно-правовых актах. В результате существует целый класс продуктов, которые применяются в клинической практике без законодательно установленных правил обращения. Соответственно отсутствует и государственный контроль за оборотом и последствиями применения таких продуктов. К таким продуктам относятся те, которые получают без использования этапа культивирования клеток, соответственно, в терминологии Федерального закона № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах» от 23 июня 2016 г, они не являются

биомедицинскими клеточными продуктами. К таким продуктам можно отнести стромально-васкулярную фракцию клеток жировой ткани, мононуклеары костного мозга и плазму, обогащенную тромбоцитами. Некоторое время назад такие продукты называли минимально манипулированными. Причем для их получения существуют специальные медицинские изделия, которые позволяют проводить обработку биологического материала в закрытых одноразовых контурах. Некоторые из таких медицинских изделий зарегистрированы Росздравнадзором и разрешены для клинического применения. Другие медицинские изделия доступны на рынке без регистрационного удостоверения и ошибочно позиционируются дистрибьюторами как разрешенные, именно ввиду отсутствия правил обращения на рынке клеточных продуктов, которые могут быть получены с их помощью.

Вместе с этим у практикующих врачей часто возникает вопрос — можно или нельзя применять клеточные продукты, полученные с помощью таких изделий. С учетом постоянного развития технологий, наличия выработанного с участием профессиональных сообществ правового поля в странах ЕС и США, а также данных, подтверждающих эффективность и безопасность минимально манипулированных продуктов, рынок медицинских изделий для их получения постоянно растет, в том числе и в Российской Федерации. Существующие проблемные вопросы государственного регулирования обращения клеточных продуктов всех типов, оценка правовых рисков сложившейся ситуации для врачей и пациентов требует обсуждения профессиональным сообществом и инициации внесения изменений в действующее законодательство.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕНСТРУАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В КОНТЕКСТЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ

**Р.Ю. Еремичев¹, М.А. Кулебякина²,
П.П. Нибирицкий^{1,2}, М.Г. Егизарян²,
Н.А. Александрович^{1,2}, П.И. Макаревич^{1,2}**

¹ Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

romaneremichev@gmail.com

Эндометрий — уникальная часть женского организма, которая повреждается и затем полностью восстанавливается во время каждой менструации. Быстрая эпителизация и отсутствие образования грануляционной ткани с дальнейшим образованием рубца являются важнейшими отличительными особенностями процесса его заживления. Стромальные клетки эндометрия (СКЭ) могут быть источником эпителиоцитов за счет мезенхимно-эпителиального перехода или особым образом взаимодействовать с клетками эпителия, способствуя быстрой эпителизации. Также не исключено, что СКЭ устойчивы к действию стимулов, индуцирующих фиброплазию. При этом в настоящий момент не сложилось единого мнения о механизме участия СКЭ в регенерации эндометрия.

Целью работы было расширение представлений о том, каким изменениям подвергаются СКЭ во время менструации.

Задачи: оценить изменение маркеров эпителия (Е-кадгерин, цитokerатины), миофибробластов (α -гладкомышечный актин, винкулин), продукции белков межклеточного матрикса (фибронектин, коллаген I,

коллаген IV, ламинин) под действием растворимых факторов менструального отделяемого здоровых женщин.

СКЭ и менструальная жидкость, содержащая растворимые факторы были выделены по отработанному ранее протоколу из менструальной крови добровольных доноров (n=3). В качестве контроля использовали сыроворотку венозной крови (СК), полученную во второй день менструации. Выделенные СКЭ 4–5 пассажа затем культивировали в присутствии 10% МЖ или СК в течение 9 дней. В конечной точке мы проводили визуализацию исследуемых молекул путем иммуноцитофлуоресценции и количественный анализ методом иммуноблоттинга.

Культивирование с МЖ статистически значимо ($p < 0,05$) повышало количество коллагенов I и IV по сравнению с СК. При этом наблюдалось снижение количества фибронектина, винкулина и α -гладкомышечного актина, а количество ламинина и цитокератинов не отличалось. Белки межклеточного матрикса локализовались во внеклеточном пространстве, α -гладкомышечный актин — в стресс-фибриллах, при этом небольшая доля клеток была положительна на цитокератины.

Таким образом, во время менструации под влиянием растворимых факторов окружения СКЭ увеличивают продукцию молекул межклеточного матрикса и компонентов базальной мембраны, необходимых для быстрого восстановления целостности и эпителизации. В то же время не отмечается признаков перехода СКЭ в миофибробласты, который возможен для этих клеток при культивировании с СК.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30007.

АПОПТОЗ: РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ DEB-СОДЕРЖАЩИМИ БЕЛКАМИ

**Виктория Вячеславовна Ерофеева¹,
Виктор Васильевич Глебов¹, Елизавета
Вячеславовна Аникина¹, Ксения Юрьевна
Михайличенко¹, Гульнара Александровна
Кулиева¹, Светлана Васильевна Горюнова²**

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

² Московский городской педагогический университет, Москва, Россия

vg44@mail.ru

Апоптоз является важным механизмом регуляторных процессов в организме всех многоклеточных организмов, который осуществляется на основе двух основных сигнальных путей: 1. Внешней, передаваемой с помощью рецепторов смерти (death receptors) и 2. Внутренней (митохондриальный), за счет антигена CD95, являющимся одним из рецепторов смерти.

Белки каспаза-8 и c-FLIP регулируют непосредственно запуск процесса клеточного уничтожения. На клеточном уровне (клеточная мембрана, цитозоль), отмечается комплексная связь белков. Данные механизмы сигнальной связи, позволяют регулировать запускать процессы ликвидации клеток. Механизмы апоптоза в клетке непосредственно связаны каспазой-8 (CASP8). Однако процесс может также подавляться с помощью белков c-FLIP, которые подавляют работу каспазы-8.

Другим механизмом регуляции клеточной популяции, который может проходить в цитозоле является использование транскрипционного фактора NF- κ B. В исследованиях зарубежных и отечественных ученых отмечено, что в ходе процесса происходит

расщепления белков с-FLIP до фрагментов (p22-FLIP). Вместе с этим получаемые белковые фрагменты могут оказывать влияние на активность транскрипционного фактора NF-κB. Изучения данного процесса показали, что каспаза-8 не активируется по сравнению с его активацией в комплексе DISC (сигнальный комплекс, запускающий смерть клетки). При таком пути имеются следующие особенности. Отмечается ферментативная активность. Она осуществляется за счет работы четвертичной структуры белка (гетеротетрамера). Есть предположение, что такой путь дает возможность формировать комплексы между белками, в частности между CASP8 и с-FLIP.

Заключение. Таким образом, существуют различные пути взаимоотношения и регуляции программируемой смерти клеток. Они осуществляются на клеточном уровне и являются базовыми. С помощью данных механизмов в организме могут осуществляться при разных условиях окружающей среды регуляционные процессы. Данные процессы еще не совсем хорошо изучены и поэтому данное направление является задачей будущих исследований.

Публикация подготовлена при поддержке программы РУДН «5-100».

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ФОРМА БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА БТШ70: ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗОГЕННОГО БТШ70 ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ НК-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Софья Алексеевна Ерохина, Мария Алексеевна Стрельцова, Юлия Дмитриевна Тетерина, Леонид Михайлович Каневский, Елена Ивановна Коваленко, Сергей Михайлович Деев, Александр Михайлович Сапожников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

sonya.erokhina@gmail.com

Хорошо известно, что внутриклеточные белки теплового шока (БТШ), в частности БТШ70, играют важную роль в системе протеостаза, вовлеченной в большинство репаративных и регенеративных процессов в норме и патологии. Наряду с этим, в настоящее время накопилось много свидетельств о значимых, но пока малоизученных функциях внеклеточного, сывороточного пула БТШ70, циркулирующего в организме как здоровых, так и больных протестированных доноров. В ряде публикаций, и в наших предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что внеклеточные БТШ70 адсорбируются на поверхности разных типов клеток, в том числе на погибающих и опухолевых клетках. Более того, было показано, что многие типы инфицированных и трансформированных клеток характеризуются экспрессией мембрано-ассоциированных БТШ70 в отсутствие внеклеточного пула этих протеинов. В связи с этим, мы предположили, что взаимодействие внеклеточных БТШ70 с клеточной поверхностью направлено на элиминацию «неблагоприятных» для организма клеток системой иммунологического надзора. Действительно, активация цитотоксической активности клеток-эффекторов системы врожденно-иммунитета (в частности, НК-клеток) против клеточных мишеней, экспонирующих на своей поверхности БТШ70 было описано в целом ряде работ и в наших

предыдущих публикациях. Данные, полученные в наших последних исследованиях и представленные в данном сообщении, являются результатами продолжения указанного проекта. Они свидетельствуют о фундаментальной значимости феномена формирования в организме внеклеточной формы БТШ70 для системы иммунологического надзора, и о возможности применения экзогенных БТШ70 для комбинированной НК-клеточной противоопухолевой терапии, а также для направленной регуляции процессов регенерации тканей и органов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-75-10120.

УЧАСТИЕ НЕКОДИРУЮЩИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК, СЕКРЕТИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ И РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ

Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}, Анна Григорьевна Сорокина¹, Ольга Александровна Григорьева¹, Екатерина Сергеевна Новоселецкая^{1,2}, Наталья Андреевна Басалова^{1,2}, Наталья Андреевна Александровна^{1,2}, Наталья Игоревна Калинина², Яна Артуровна Орлова¹, Елена Викторовна Парфенова^{2,3}, Всеволод Арсеньевич Ткачук¹⁻³

¹ Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Россия

efimenkoan@gmail.com

Залогом нормального функционирования многоклеточных организмов является постоянное обновление тканей и их восстановление после повреждения. Во многих исследованиях установлено участие в этих процессах МСК как важного клеточного компонента ниш практически всех типов резидентных стволовых клеток и одного из ключевых регуляторов баланса между репарацией и регенерацией тканей. МСК способны реагировать на широкий спектр регуляторных сигналов и могут перепрограммировать микроокружение путем продукции различных компонентов, в первую очередь, с помощью секретиремых в составе внеклеточных везикул регуляторных некодирующих РНК. Поэтому крайне актуальным является вопрос об изменении регуляторных свойств этих клеток под воздействием сигналов от поврежденной и патологически измененной ткани, не вызывающих гибели клеток, но приводящих к существенным изменениям их функциональной активности. При этом МСК могут приобретать признаки сенесцентных клеток, характеризующихся остановкой клеточного цикла, изменениями структуры хроматина, снижением эффективности системы репарации ДНК и специфическим секретомом, ассоциированным со старением (SASP). Нами показано, что под влиянием процессов, происходящих в организме человека при старении и развитии хронических ишемических и метаболических заболеваний, происходит ускоренное старение МСК и накопление в популяции клеток со свойствами сенесцентных, опосредующих нарушения регуляторной функции МСК, в значительной степени за счет изменения их секретомы. Одним из возможных механизмов

фиксации результатов воздействия различных по природе повреждающих сигналов, закрепляющихся в МСК, является изменение паттерна некодирующих РНК (включая микроРНК), секретируемых клетками и оказывающих существенное влияние на формирование их микроокружения при адаптивном ремоделировании поврежденных тканей. Учитывая критическую роль МСК в регуляции процессов заживления тканей после повреждения, длительная персистенция в тканях таких клеток может приводить к ухудшению регенераторного потенциала тканей и являться важной составляющей патогенеза многих заболеваний.

Работа по оценке накопления маркеров сенесцентных клеток в популяции МСК выполняется в рамках государственного задания МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, работа по оценке функциональных свойств и секретома МСК поддержана грантом РФФИ № 19-29-04172.

ГЛУБОКОЕ ОБУЧЕНИЕ ДЛЯ ТРЕКИНГА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕСТИРОВАНИИ МАТЕРИАЛОВ БИМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

**Богдан Эдуардович Ефименко,
Константин Андреевич Прокин**

*Балтийский Федеральный Университет
им. Иммануила Канта, Калининград, Россия*

bogdan-efimenko@list.ru

Введение. Современные материалы биомедицинского назначения не являются универсальными, поэтому создание и адаптация конструкций на их основе требует дополнительного тестирования, что является одним из приоритетных направлений регенеративной медицины.

Известным методом тестирования новых биоматериалов является отслеживание и анализ общих трендов движения и жизнеспособности клеток макроорганизма при сокультивировании с исследуемыми материалами. Однако существующие способы обработки данных движения клеток не адаптированы под трекинг использованных в работе мультитипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Таким образом, целью данного исследования являлась разработка алгоритма автоматического анализа трендов движения ММСК в рамках тестирования материалов биомедицинского назначения.

Материалы и методы. Материалом исследования служили изображения, полученные с помощью системы визуализации Cell-IQ, предоставленные Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта.

Размеченные изображения использовались для дообучения нейронной сети Faster-RCNN-Inception-V2 с помощью Tensorflow object detection API. Обученная нейросеть на каждом изображении детектировала клетки, движение которых отслеживалось трекером на основе растояний центроид.

Данные о подвижности ММСК позволили оценить биосовместимость исследуемых материалов.

Результаты. В результате работы был построен алгоритм автоматического анализа трендов движения ММСК для длительных экспериментов в тестировании новых биомедицинских материалов.

Полученный алгоритм работает в сотни раз быстрее человека: на разметку 3000 изображений требуется не более 4х часов на стационарном компьютере.

Качество детекции отдельных клеток составляет свыше 90% верно присвоенных меток.

Выводы. Современные подходы к анализу изображений позволяют оптимизировать и ускорить процесс тестирования биоматериалов. В дальнейшем планируется улучшение качества детекции и трекинга клеток на изображениях, а также точное определение размеров каждой клетки.

Выражается благодарность сотрудникам Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта за предоставление данных и руководство.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕТАЛЬНЫХ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА

Жулдызай Алдановна Жанатаева, Алия Зейнуллаевна Оспанова, Ольга Владимировна Ульянова, Дина Александровна Серебренникова

*АО «Национальный научный медицинский центр»,
Нур-Султан (Астана), Казахстан*

janat@mail.ru

Актуальность. Сахарный диабет 1 типа — системное аутоиммунное заболевание эндокринной системы, вследствие прогрессирующей деструкции β -клеток поджелудочной железы которой развивается инсулиновая недостаточность. Диабет является одним из четырех приоритетных неинфекционных заболеваний (НИЗ), принятие мер в отношении которых запланировано на уровне мировых лидеров. Таким образом, являясь одной из самых социально-значимых патологий, заболевание требует разработку и внедрение новых высокоэффективных методов лечения.

Цель: изучить эффективность трансплантации фетальных островковых клеток поджелудочной железы человека у больных сахарным диабетом I типа.

Материалы и методы. Фетальные островковые клетки получены из абортного материала сроком гестации 16–19 недель. Клетки были культивированы в среде DMEM («Sigma», США) с добавлением 10% FBS («Hy Clone», США).

Трансплантацию фетальных клеток поджелудочной железы проводили в комплексе со стандартной сахароснижающей терапией в условиях отделения реанимации с помощью аппарата Perfusor compact S B. Braun Melsungen AG. Содержание клеток в 1 мл $4\text{--}6 \times 10^9$, введенные в 10 мл 0,9% NaCl.

Результаты: 30 пациентов до трансплантации фетальных клеток поджелудочной железы имели следующие показатели: гликолизированный гемоглобин $9,52 \pm 1,96$ (%); С-пептид $0,092 \pm 0,013$ (нг/мл); дозы инсулина $46,60 \pm 6,69$ (ЕД).

Спустя 6 месяцев после трансплантации аллогенных клеток островков Лангерганса были получены положительные результаты по коррекции сахарного диабета: гликолизированный гемоглобин $7,84 \pm 1,11$ (%), $P < 0,005$; С-пептид $0,202 \pm 0,075$ (нг/мл), $P < 0,008$; дозы инсулина $25,20 \pm 11,30$ (ЕД) $P < 0,500$. P -вероятность различий до и после трансплантации. Удалось добиться нормализации уровня глюкозы в крови.

Выводы. По полученным результатам, трансплантация фетальных клеток поджелудочной железы привело к достоверному увеличению уровня С-пептида у пациентов с сахарным диабетом типа 1 ($p < 0,05$). Улучшение показателя углеводного обмена в виде снижения средних

значений тощаковой и постпрандиальной гликемии, средних значений гликолизированного гемоглобина, повышение средних значений С-пептида наряду с уменьшением потребности в экзогенном инсулине свидетельствовало о стимуляции регенерации резервов собственных β -клеток поджелудочной железы.

Более подробно результаты исследования будут представлены в постерном докладе.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МСК IN VITRO ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Иван Владимирович Живодерников, Андрей Юрьевич Ратушный, Диана Константиновна Матвеева, Людмила Борисовна Буравкова

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

kordait-2213@yandex.ru

Внеклеточный матрикс является субстратом для адгезии клеток, их роста и дифференцировки, а также осуществляет механическую поддержку. Хорошо известно, что клетки соединительных тканей адаптируют свой матрикс к изменениям механической нагрузки. В условиях микрогравитации (в космических полетах или наземном моделировании) механическая (гравитационная) нагрузка значительно снижается. Это приводит к ремоделированию цитоскелета гравичувствительных клеток, в том числе мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Показано, что микрогравитация вызывает в МСК динамические изменения экспрессии белков цитоскелета и молекул адгезии. Необходимо отметить, что многие из этих сдвигов являются обратимыми. Основной целью данной работы было изучение экспрессии генов, отвечающих за синтез белков внеклеточного матрикса (ВКМ) и молекул адгезии МСК.

Для выполнения этой задачи мы использовали МСК, которые выделили из жировой ткани. Эксперимент включал статический контроль и серию с моделированием эффектов микрогравитации при помощи Random Positioning Machine (RPM). Для изучения экспрессии генов использовали ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и набор «Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules» (Qiagen, США).

После экспозиции на RPM в течение 10 суток было отмечено повышение экспрессии гена *LAMB3*, — гликопротеинового компонента ВКМ. Снизилась экспрессия *TIMP1* и *TIMP3*, являющихся ингибиторами матриксных металлопротеиназ, исходя из чего можно предположить о повышенной активности последних. Из группы генов матриксных металлопротеиназ только *MMP11* ответил на микрогравитацию снижением экспрессии. Возросла экспрессия *TNC* (тенасцин) — белка, присутствующего в костной и хрящевой тканях, а также в сухожилиях. Избыток тенасцина препятствует распластыванию клеток в культуре, поскольку тенасцин связывается с фибронектином и может ингибировать взаимодействие интегринов клеток и фибронектина. С другой стороны, экспрессия *CTNND1*, гена якорного белка, стабилизирующего кадгерин, возросла.

Полученные транскриптомные сдвиги указывают на возможное увеличение подвижности МСК и открепление от субстрата в условиях микрогравитации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90005.

РЕГЕНЕРАЦИЯ, ГИБЕЛЬ КЛЕТОК И РАК

Борис Давидович Животовский^{1,2}

¹ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция

boris.zhivotovsky@ki.se

В основе контролируемой регенерации клеток и тканей лежат такие важные физиологические процессы как дифференцировка и пролиферация. Оба данных процесса, вместе с механизмом, регулирующим программируемую гибель клеток, способны поддерживать гомеостаз тканей. Следовательно, чувствительность стволовых клеток, участвующих в процессе регенерации, к программируемой гибели должна быть хорошо скоординирована. Действительно, в последние годы появились работы, указывающие на тесную и достаточно сложную связь между этими процессами. Так, установлено, что гибель клеток способна стимулировать регенерацию тканей и заживление ран. С другой стороны, есть примеры, когда активация гибели клеток блокирует регенерацию. Более того, взаимодействие между различными типами гибели влияет на чувствительность стволовых клеток к воздействию. Известно, что образующиеся при воспалении активные формы кислорода способны уничтожать патогены и стимулировать процессы восстановления и регенерации тканей. Однако, эти же химические вещества могут повреждать ДНК, что, в свою очередь, может способствовать накоплению мутаций, которые способны инициировать развитие рака. Установлено также, что клеточные ответы на повреждение ДНК, такие как передача сигналов о повреждениях и цитотоксичность, могут способствовать воспалению, создавая петлю положительной обратной связи. В настоящей работе будут обсуждены вопросы, касающиеся взаимодействия между процессами регенерации тканей, различными механизмами гибели клеток и, как возникновением, так и терапией рака.

Работа поддержана грантами РФФИ (19-15-00125, раздел «механизмы гибели клеток») и РФФИ (18-29-09005, раздел «возникновение и терапия рака»).

ИЗМЕНЕНИЕ В ПОВЕДЕНИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ НА МОДЕЛЯХ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА IN VIVO

Мargarita Николаевна Журавлева¹, Эльвира Руслановна Ахметзянова¹, Александр Александрович Костенников¹, Яна Олеговна Мухамедшина^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

k.i.t.t.1807@gmail.com

Клетки микроглии — это иммунные клетки центральной нервной системы, являющиеся ключевыми участниками всех воспалительных реакций. Фенотип микроглии во многом определяет течение посттравматических реакций в спинном мозге, оказывая нейрорегенеративный или нейродегенеративный эффект. В то же время, любое изменение в микроокружении способно сдвигать фенотип микроглии в ту или иную сторону. В связи с этим, интересным представляется изучение поведения клеток микроглии при различных степенях повреждения в хронический период после травмы спинного мозга крыс.

Всем экспериментальным группам животных наносили дозированную контузионную травму спинного мозга при помощи Leica Impact One Stereotaxic Impactor. Животных разделили на группы с легкой (1,5 м/с), средней (2,5 м/с) и тяжелой (4 м/с) степенью травмы. На 60 сутки после операции животных перфузировали 4% формалином с последующим забором ткани спинного мозга и получением тонких гистологических срезов. Полученные образцы спинного мозга подвергали иммуногистохимической окраске на антитела против Iba1, TNF α и TGF β .

Полученные результаты показали достоверные различия в поведении клеток микроглии в спинном мозге интактных и травмированных животных. Кроме того, поведение микроглии отличалось в группах животных с различными степенями травмы спинного мозга в зонах передних рогов, вентральных канатиков и кортико-спинального тракта.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00141.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ СЛИЗИСТОЙ НИЖНЕЙ ГУБЫ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА

Кирилл Эдуардович Журенков¹, Ольга Игоревна Александрова¹, Илья Олегович Гаврилюк², Светлана Алексеевна Александрова¹, Наталья Михайловна Ярцева¹, Татьяна Вячеславовна Машель¹, Юлия Игоревна Хорольская¹, Галина Алексеевна Писугина¹, Дарья Александровна Переплетчикова¹, Миральда Ивановна Блинова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

kirill.zhurenkov.97@mail.ru

В современной трансплантологии существует острый дефицит донорского материала, в связи с чем активно развиваются альтернативные подходы по созданию биоинженерных конструкций (БИК), обладающих потенциальной возможностью заменить донорский материал. Наиболее перспективными в этой области являются подходы по 3D-биопринтингу тканей и органов, однако их применение ограничено несовершенством методик создания тканевых конструктов, а также высокой стоимостью технологий. Поэтому в данный момент самым оптимальным методом является использование БИК, сконструированных на основе различных стволовых клеток и клеточного носителя. Из большого количества исследованных стволовых клеток одними из перспективных являются стволовые клетки слизистой нижней губы (СКСНГ). Т.к., во-первых, забор биоптата слизистой является нетрудоемким и не сопряжен с рисками для здоровья пациента, во-вторых, выделяемые из нее клетки являются аутологичными для реципиента.

Настоящая работа посвящена характеристике (анализу кариотипа, а также пролиферативного и дифференцированного потенциала) СКСНГ и оценке возможности создания на их основе БИК для применения в регенеративной медицине.

Характеристику проводили на клетках, выделенных из слизистой нижней губы кролика и человека. Кроме того, СКСНГ кролика использовали для конструирования БИК, состоящих из данных клеток и децеллюляризованной человеческой амниотической мембраны в качестве клеточного носителя. Терапевтический потенциал сконструированных БИК оценивали при лечении лимбальной

недостаточности в эксперименте *in vivo* на кроликах. В работе получены данные, основываясь на которых, можно сделать выводы о высокой пролиферативной активности СКСНГ и их способности дифференцироваться в различных направлениях. Кроме того, было установлено, что СКСНГ имеют стабильный набор хромосом с низким процентом хромосомных перестроек. Результаты иммуноцитохимического анализа продемонстрировали стволовую природу исследованных клеток (экспрессия набора таких маркеров, как: ABCB5, ABCG2, ALDH3A1, NGF-R(p75), р63 α), наравне с этим была выявлена экспрессия эпителиальных маркеров (СК3/12, СК14, СК15). Трансплантация БИК, созданных на основе СКСНГ кролика и амниотической мембраны, обеспечила восстановление «нормальной» эпителизации роговицы, а также способствовала сохранению ее прозрачности.

Полученные данные позволяют судить о потенциальной возможности использования данного типа клеток в тканевой инженерии, в частности для восстановления эктодермальных тканей.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ШТАММА BACILLUS SUBTILIS В-9906 НА МОДЕЛИ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ

Николай Александрович Забокрицкий

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

pharmusma@rambler.ru

Экспериментальную оценку цитопротекторного действия биологически активных веществ (БАВ), продуцируемых штаммом *Bacillus subtilis* В-9906 осуществляли на гепатоцитах в условиях моделирования токсического поражения четыреххлористым углеродом (CCl₄) клеточной популяции.

В результате проведенного эксперимента установлено, что в испытуемых пробах, моделирующих токсическое поражение гепатоцитов, было установлено значительное угнетение пролиферативной активности на различные сроки наблюдения (24, 48 и 96 часов).

Существенный интерес представляло изучение влияния комплекса БАВ и CCl₄ при их различных соотношениях на митотическую активность эксплантационных гепатоцитов на различные сроки наблюдения.

С этой целью были сформированы следующие тест-системы:

I — гепатоциты, в ростовую среду которых вносили двукратную минимальную токсическую дозу CCl₄ (2 мкг/мл⁻¹) и 0,5 максимального количества БАВ, не ингибирующее рост гепатоцитов (1,5 мг/мл⁻¹);

II — гепатоциты, в ростовую среду которых вносили двукратную минимальную токсическую дозу CCl₄ (2 мкг/мл⁻¹) и максимальное количество БАВ, не ингибирующее рост гепатоцитов (3,0 мг/мл⁻¹);

III — гепатоциты, в ростовую среду которых вносили минимальную токсическую дозу CCl₄ (1 мкг/мл⁻¹) и 0,5 максимального количества БАВ, не ингибирующее рост гепатоцитов (1,5 мг/мл⁻¹);

IV — гепатоциты, в ростовую среду которых вносили минимальную токсическую дозу CCl₄ (1 мкг/мл⁻¹) и максимальное количество БАВ, не ингибирующее рост гепатоцитов (3,0 мг/мл⁻¹);

V — контрольная проба — интактная культура гепатоцитов.

Цитопротекторную эффективность БАВ в условиях моделирования токсического поражения выделенных гепатоцитов определяли по изменению плотности монослоя клеток. Регенеративную активность гепатоцитов оценивали по изменению митотического индекса.

Таким образом, в результате выполненных экспериментов можно сделать вывод о том, что биологически активные вещества пробиотического штамма *Bacillus subtilis* В-9906 обладают значительным цитопротекторным действием, непосредственно защищают гепатоциты от токсического поражения, а также способны оказывать определенное воздействие на регенерацию клеток (увеличение митотического индекса), что является значимым фактором для использования этих метаболитов в качестве основы для создания новых перспективных лекарственных кандидатов фармакологической группы — гепатопротекторы.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1.

РАЗРАБОТКА НОВОГО СПОСОБА ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ОЦЕНКИ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПЕЧЕНИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА

Елена Вадимовна Загайнова¹, Дарья Сергеевна Кузнецова¹, Светлана Алексеевна Родимова^{1,2}, Дмитрий Георгиевич Реунов^{1,2}, Александр Андреевич Гулин³, Николай Викторович Бобров⁴, Наталья Всеволодовна Вдовина¹, Владимир Евгеньевич Загайнов^{1,4}

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

² Национальный исследовательский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

³ Институт химической физики им. Семенова РАН, Москва, Россия;

⁴ Приволжский окружной медицинский центр ФМБА, Нижний Новгород, Россия

ezagaynova@gmail.com

Регенерация печени является основным механизмом восстановительного процесса при травмах и после хирургической резекции. Интраоперационная оценка регенеративного потенциала печени актуальна для прогнозирования состояния органа и пациента после операции. Стандартные диагностические тесты (УЗИ, СПЕКТ КТ, МРТ, морфология, биохимические анализы) не решает эту задачу. Для этой цели мы предлагаем разработать способ безконтрастной (label free) оценки состояния печени на основе многофотонной микроскопии с функцией метаболического имиджинга (FLIM) и генерации второй гармоники (SHG).

Чтобы разработать метод интраоперационной оценки состояния печени, мы провели экспериментальные исследования на животных: моделирование холестаза, цирроза печени, жирового гепатоза, 30% и 70% резекции печени с оценкой метаболических и структурных изменений в нормальной печени, при развитии патологии и регенерации. Мы также проанализировали свежие хирургические образцы печени пациентов после резекции. Использовался многофотонный микроскоп LSM 880 с FLIM и SHG, Мультифотонный томограф JenLab. Полученные результаты были проверены с помощью химического картирования TOF-SIMS, морфологического и иммуногистохимического

анализа с идентификацией рекрутированных стволовых клеток.

Были выявлены характерные особенности холестаза — резкое увеличение сигнала билирубина в канале FAD и цирроза — увеличение полей сигнала ГВГ. Жировой гепатоз характеризовался внутриклеточным накоплением жировых капель при отсутствии сигнала от эндогенных флуорофоров по всем каналам. Изменения печени у модельных животных совпали с данными на хирургических образцах пациентов.

При всех патологических состояниях отмечалось образование зон поврежденных клеток с пониженной интенсивностью сигнала НАДН и уменьшением вклада связанной формы. При регенерации, напротив, на 3 день наблюдалось увеличение количества активно пролиферирующих клеток с усиленным образованием энергии (увеличение связанной формы НАДН).

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ И ПОРИСТЫХ МИКРОЧАСТИЦ ПОЛИЛАКТИДА

Юрий Дмитриевич Загоскин¹, Тимофей Евгеньевич Григорьев¹, Никита Михайлович Кузнецов¹, Валерия Сергеевна Кузнецова², Андрей Вячеславович Васильев^{2,3}, Татьяна Борисовна Бухарова³, Дмитрий Вадимович Горьдштейн^{2,3}, Сергей Николаевич Чвалун^{1,4}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;

⁴ Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

zagos@inbox.ru

При осуществлении дентальной имплантации часто возникает необходимость в проведении остеопластической операции. На сегодняшний день для устранения костных дефектов активно используют аутогенную костную крошку. Однако такой материал обладает рядом существенных недостатков: травма донорской зоны, использование барьерных мембран и др. Применение биоразлагаемых полимерных гидрогелей с включенным костным морфогенетическим белком (rhBMP-2) позволит восполнять утраченную ткань без описанных выше недостатков. Однако подобные материалы обладают довольно низкой прочностью и плохо задерживают выделение rhBMP-2. Создание композиционных материалов на основе гидрогелей с включенными пористыми микрочастицами полилактида существенно увеличивает прочностные характеристики материалов, а разработанная методика импрегнации rhBMP-2 в объем частиц позволила заметно снизить скорость высвобождения белка (до пяти суток).

В рамках данной работы были получены композиционные материалы на основе термоотверждаемого при 37°C гидрогеля хитозана и β-глицерофосфата. Добавление частиц до 10 масс.% к гидрогелю приводит к увеличению модуля упругости до 200 кПа. Помимо этого в качестве матрицы были использованы тромбин-фибриногенный и коллагеновый гидрогели.

С точки зрения манипулятивных свойств УФ-отверждаемые биоразлагаемые гидрогели наилучшим образом подходят для подобных задач. Поэтому был синтезирован маленированный хитозан и разработана методика получения УФ-отверждаемого гидрогеля на основе модифицированного хитозана и полиэтиленгликоль диакрилата. В качестве фотоинициатора использовали Irgacure 2959. Полученный таким образом гидрогель показал прочность свыше 200 кПа, а деформацию разрушения около 16%.

Полученные материалы были исследованы на *in vitro* и *in vivo* биосовместимость.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФ № 16-15-00298-П.

КОРРЕКЦИЯ ОПОРНОЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ДЕФЕКТА КОСТНОЙ ТКАНИ ОСТЕОТРАНСПЛАНТАТОМ

Алла Михайловна Зайдман¹, Александр Игоревич Шевченко², Елена Леонидовна Строкова¹, Аркадий Федорович Гусев¹, Ирина Анатольевна Кирилова¹, Владимир Михайлович Субботин³

¹ ФГБУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, Россия;

² ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

³ Arrowhead Pharmaceuticals, Madison WI, and University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, USA

AZaydman@niito.ru

Костная ткань в течении всего онтогенеза постоянно обновляющаяся система, которая обеспечивает образование опорной и гемопозитической ткани в необходимом количестве. В связи с этим восстановление структурной и функциональной целостности костной ткани является одним из приоритетных направлений регенераторной медицины.

Впервые путем остеогенной дифференцировки хондротрансплантата (патент № 2574942) создан предкостный трансплантат, который в культуральной среде проходит первичные стадии остеогенеза и минерализации (синтез остеоида и формирование матричных пузырьков).

В остеотрансплантате формируются сосудистые полости с эндотелиальной выстилкой, экспрессирующие фактор Виллебранда и изолектин В4. В матрике детектируются антиген CD 44, коллаген I типа, фибронектин, остеоонектин и остеоопонтин. В клетках экспрессируются гены: *Alp*, *On*, *Bsp*, *Runk*.

Канальцевая система метаболизма хондротрансплантата сменяется на оксигенетическую (сосудистую). Структурная композиция трансплантата подобна эмбриональной предкостной ткани на ранних стадиях остеогенеза.

Дальнейшие этапы дифференцировки остеогенный трансплантат проходит в реципиентном ложе под влиянием локальных и дистантных регуляторов, которые поступают через сформированные сосуды трансплантата. В трансплантате наблюдается пролиферация остеобластов, интенсивный ангиогенный остеогенез, на основе которого формируется органоспецифическая костная ткань, содержащая в межтрабекулярных промежутках миелоидный костный мозг. Этот факт свидетельствует о полной интеграции остеотрансплантата с организмом реципиента.

Заключение. Пластическое замещение дефекта костной ткани остеотрансплантатом приводит к коррекции как опорной, так и метаболической функции бывшего дефекта.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СОСУДОВ

Ирина Сергеевна Захарова¹⁻³, Мария Константиновна Живень¹⁻³, Елена Сергеевна Ступникова⁴, Александр Игоревич Шевченко¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Лаборатория эпигенетики развития, ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Лаборатория молекулярной и клеточной медицины, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Лаборатория стволовой клетки, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

zakharova.is@gmail.com

Сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться лидирующей причиной смертности и инвалидизации людей во всем мире. В данном исследовании в рамках разработки клеточных технологий для регенерации сосудов реализуются два направления: разработка подхода преодоления потенциальной туморогенности делящихся клеток при использовании в заместительной клеточной терапии и получение генетически модифицированных эндотелиальных производных с повышенным ангиогенным потенциалом.

В рамках первого направления разработан способ инактивации митотического деления эндотелиальных и гладкомышечных клеток, в результате которого они сохраняют свои морфо-функциональные свойства и ангиогенный потенциал *in vitro* и *in vivo*. При этом исследование туморогенного потенциала митотически инактивированных клеток на модели иммунодефицитных мышей SCID на протяжении 90 дней не выявило признаков образования опухолей.

В рамках второго направления получены линии плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, в которых с помощью метода CRISPR/Cas9 внесена делеция участка гена *INT6* — ингибитора фактора, индуцируемого гипоксией, HIF2a. В результате удалось получить ПСК с повышенной экспрессией *HIF2a* в нормоксических условиях. Полученные генетически модифицированные линии ПСК дифференцировали в эндотелиальном направлении. Делеция *INT6* и опосредованное отсутствием ингибитора повышение и стабилизация в нормоксических условиях HIF2a в ПСК человека привело к повышению эффективности мезодермальной и впоследствии эндотелиальной дифференцировки. В эндотелиальных производных генетически модифицированных ПСК выявлено повышение уровня экспрессии ряда ангиогенных факторов. Оценка ангиогенного потенциала показала, что количество сосудоподобных структур в генетически модифицированных субклонах более, чем в 3 раза превышает значения для контрольных линий. Таким образом, впервые показано, что генетически модифицированные ПСК человека с повышенной экспрессией *HIF2a* более эффективно дают эндотелиальные производные, обладающие повышенным ангиогенным потенциалом.

Оба направления исследований могут стать основой для разработки способов повышения ангиогенного потенциала васкулярных клеток и получения биомедицинских клеточных продуктов, применяемых для регенерации сосудов.

Работа по разработке способа митотической инактивации клеток поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН, работа по направленной эндотелиальной дифференцировке ПСК поддержана грантом РФ № 17-75-10047.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОИНТЕГРАЦИИ ПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

Алена Игоревна Звягина¹, Ирина Сергеевна Фадеева¹, Владислав Валентинович Минайчев¹, Полина Олеговна Теплова^{1,2}, Анатолий Сергеевич Сенотов¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

² ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

alennazvyagina@gmail.com

Изготовленные из перикарда барьерные мембраны (БМ) являются востребованным материалом в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Однако, результаты клинического применения этих материалов зачастую демонстрируют отсутствие желаемого эффекта и развитие связанных с БМ осложнений, причины которых до сих пор не изучены. Одновременно с этим, данные последних исследований указывают, что способность биоматериалов к интеграции с тканями реципиента является одним из основных факторов успешного восстановления дефектов.

Целью данной работы являлась оценка влияния основных компонентов и архитектоники внеклеточного матрикса (ВКМ) на биоинтеграцию перикардиальных БМ в модели гетеротопической имплантации крысам в динамике. По результатам эксперимента была выявлена специфика биоинтеграции экспериментальных коллагеновых и эластиновых БМ, изготовленных по разработанным авторами матрикс-сберегающим протоколам децеллюляризации (РФ № 2678966). В качестве контроля сравнения использовали коммерческие мембраны BioGide (Geistlich Biomaterials, Швейцария) и перикардиальные БМ ЦИТО им. Н.Н. Приорова (РФ № 2360690).

Группа экспериментальных образцов показала зависимость основных процессов биоинтеграции (степень репопуляции, неоваскуляризации и ремоделирования) от состава и архитектоники ВКМ БМ. Было показано, что эластиновый ВКМ способствует значительно более быстрой интеграции БМ с окружающими тканями реципиента, а также индуцирует интенсивную неоваскуляризацию в области имплантации. Коллагеновые БМ показали высокую степень сохранности структуры ВКМ даже на поздних сроках имплантации. При этом локализация процессов биоинтеграции зависела от специфической архитектоники полярных поверхностей материала. В контрольной группе индуцирующего эффекта на окружающие ткани обнаружено не было. Кроме того, на более поздних сроках имплантации наблюдалось развитие выраженной реакции организма на поврежденный ВКМ (признаки интенсивной утилизационной резорбции для материалов BioGide и развитие асептического кальциноза для материалов ЦИТО).

Таким образом, можно сделать вывод, что основной причиной развития негативных эффектов в организме является поврежденный в ходе предимплантационных работ ВКМ БМ. Кроме того, при условии сохранения

ВКМ, БМ могут оказывать индуцирующий эффект на процессы регенерации, обусловленный составом и спецификой архитектоники ВКМ БМ.

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям.

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОЙ XENO-FREE СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПАНСИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Алёна Васильевна Злацкая¹, Наталья Михайловна Тодосенко², Анжела Евгеньевна Родниченко¹, Инна Михайловна Гордиенко³, Ольга Сергеевна Губарь⁴, Дмитрий Александрович Зубов¹, Светлана Николаевна Новикова¹, Лариса Сергеевна Литвинова², Роман Геннадиевич Васильев¹

¹ Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

² Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

³ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

⁴ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

alenzlacka@gmail.com

Эндометрий человека является структурой, обладающей способностью к многократной полной регенерации и реорганизации за период репродуктивного возраста женщины (более 400 циклов). Даная способность обусловлена наличием в эндометрии пула стволовых/прогениторных клеток (эпителиальных, мезенхимальных, эндотелиальных и т. д.). Высокий пролиферативный и мультилинейный дифференцировочный потенциал, а также иммуномодулирующие свойства и стабильность генотипа при экспансии, делают эндометриальные мультипотентные мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (эММСК) перспективным объектом для использования в регенеративной медицине. Согласно текущим регуляторным требованиям, клиническое использование биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе эММСК требует их производства в xeno-free условиях. Таким образом, разработка xeno-free протоколов культивирования является актуальной задачей на пути разработки и трансляции в клиническую практику БМКП на основе эММСК.

Образцы эндометрия (n = 10) были получены путем биопсии в пролиферативной фазе менструального цикла у женщин с гипоплазией эндометрия. Во всех случаях было подписано добровольное информированное согласие. Возраст пациентов составил 34±3,3 года. Фрагменты эндометрия были диссоциированы путем ферментативной обработки. Для изучения иммунофенотипа, времени удвоения клеточной популяции (PDT), спектра продуцируемых цитокинов, хемокинов, факторов роста и уровня экспрессии генов использовали клеточные культуры 3 пассажа. В эксперименте сравнивали морфофункциональные показатели культур эММСК in vitro, культивированных на общепринятой для ММСК ростовой среде на основе эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (контроль), а также на средах с 2% и 5%

тромбоцитарного лизата (platelet lysate, PL) без добавления экзогенных факторов роста.

В ходе исследования было установлено, что в культуре эММСК на ПЗ относительное количество клеток, имеющих классический для ММСК иммунофенотип (CD90⁺CD105⁺CD73⁺CD34⁻CD45⁻HLA-DR⁻) не отличалось в контроле и группах сравнения. Также относительное количество клеток, позитивных по CD106, CD184, CD271, CD325 было на низком, тогда как количество позитивных по CD140b, CD146 было высоким во всех группах сравнения. Также было показано, что при культивировании в хепо-free условиях наблюдается увеличение относительного количества клеток позитивных по CD140a и снижение позитивных по CD166. PDT в группе с 2% PL было значительно ниже, чем в контроле и группе с 5% PL. Достоверной разницы в значении PDT в контроле и группе с 5% PL не было обнаружено. Анализ экспрессии генов *SUSD2*, *ESR-1* и *PGR* показал, что данные гены экспрессируются на одном уровне во всех группах сравнения. В то же время происходило резкое увеличение уровня экспрессии гена *ESR-2* в группе с 2% PL. Высокий уровень экспрессии генов факторов роста наблюдался в контрольной и группе с 5% PL, тогда как в группе с 2% PL уровень экспрессии данных был низким. Мультиплексный анализ секретомы эММСК показал высокую продукцию IL-1ra, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-β, MCP-1, TNF-α в контрольной и экспериментальной группах. Следует отметить, что в группе с 2% PL наблюдался самый высокий уровень продукции IL-6 и зотаксина. Продукция VEGF, PDGF-BB, RANTES, IL-12 увеличивалась в зависимости от концентрации PL. Продукция IP-10 было значительно снижена в экспериментальных группах по сравнению с контролем.

Обобщая все вышесказанное, наши результаты показывают возможность производства БМКП для использования в области регенеративной медицины на основе эММСК, при их экспансии в условиях хепо-free системы и без потери их основных морфофункциональных свойств.

РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ, АДАПТИРОВАННЫХ К ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Юрий Валерьевич Зобков¹, Антон Владимирович Миронов², Александр Юрьевич Федотов¹, Владимир Карпович Попов², Игорь Валерьевич Смирнов¹, Илья Ядигерович Бозо³, Роман Вадимович Деев⁴, Сергей Миронович Баринов¹, Владимир Сергеевич Комлев¹

¹ ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия;

² ФГУ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;

³ ООО «Гистографт», Москва, Россия;

⁴ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

zyv13@mail.ru

Разработка новых биосовместимых материалов и создание на их основе персонализированных биомедицинских изделий — клеточных и генно-инженерных конструкций, а также индивидуальных имплантатов

являются сегодня одними из важнейших направлений развития высокотехнологичного здравоохранения в развитых странах. Представленные исследования направлены на разработку новых композиционных материалов сложной химической и пространственной структуры, создание, воспроизведение и организацию биоактивных минерал-полимерных систем и каркасных структур на их основе. Данный подход основан на разработке многоуровневых трехмерных конструкций на биополимерных темплатах с последующим биомиметическим синтезом кальцийфосфатных фаз с комплексом специфических свойств, таких как, биосовместимость и контролируемое высвобождение необходимых элементов для активации и поддержания регенеративных процессов организма.

В ходе выполнения исследования были разработаны и изучены способы формирования суспензий на основе раствора альгината натрия (от 1 до 20 масс. %) и частиц октальциевого фосфата (ОКФ, от 5 до 20 масс. %), адаптированных к трехмерной струйной печати; исследовано влияния способов отверждения (отверждение заморозкой, и печать в растворы кислот и хлорида кальция) на процесс формирования и свойства биополимерных матриц; исследованы механические свойства матриц (прочность при сжатии, вязкость).

Установлены оптимальные для изготовления методом трехмерной струйной печати составы композиционных материалов — раствор альгината натрия 3–5 масс. % + ОКФ 10–16,7 масс. %. Наилучшими механическими свойствами обладают материалы отверждаемые водным 0,1 М раствором хлорида кальция — до 1,2 МПа при сжатии.

В дальнейшем планируется проведение оценки биологических свойств разработанных персонализированных гибридных композиционных материалов *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-29-11081 мк «От биоактивной керамики до персонализированных генно-инженерных конструкций». Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075-00746-19-00.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ОСТЕОМИЕЛИТЕ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИНФРАКРАСНОГО ОБЛУЧЕНИЯ И КОЛЛАГЕНА

Владимир Олегович Золотухин, Александр Анатольевич Глухов, Александр Алексеевич Андреев

Воронежский государственный медицинский университет им.Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

vladimir.zolotuxin@gmail.com

Цель исследования — повышение эффективности лечения остеомиелита путем применения хирургической санации и инфракрасного облучения гнойного очага, коллагена.

Материалы и методы. Исследование проведено на 150 самцах белых крыс линии Wistar с моделированным травматическим остеомиелитом в 5 группах: 2 контрольных и 3 опытных. В 1 контрольной группе лечение не проводилось. В остальных группах выполнялась микромоторная и гидрохирургическая санации гнойного очага, которые в 1 опытной группе были дополнены десятимин. ным инфракрасным облучением (длина волны

1060 нм) с расстояния 7 см; во 2 опытной группе — применением коллагена; в 3 опытной группе — последовательным использованием инфракрасного облучения и коллагена. Для определения выраженности перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли уровни малонового диальдегида (МДА) и 2,4-динитрофенилгидрозола (ДФНГ), которые оценивались на 7, 14, 28, 60, 90 и 120 сутки исследования.

Результаты исследования. При проведении оценки степени окислительного стресса в контрольных группах на протяжении всего времени эксперимента снижение показателей МДА и ДФНГ отсутствовало, к 120 суткам показатели остались на уровне $29,80 \pm 2,98$ нмоль/л и $76,65 \pm 3,27$ ед. опт. пл./мл, что существенно выше нормальных значений. Во 2 контрольной группе прослеживалась небольшая положительная динамика, аналогичные показатели снизились с $27,96 \pm 3,21$ нмоль/л и $68,75 \pm 3,89$ ед. опт. пл./мл на $56,7\%$ и $30,2\%$ к 120 суткам соответственно. В 1 и 2 опытных группах прослеживалась примерно одинаковая динамика. Показатели этих групп на начале эксперимента были значительно ниже, чем у 1 контрольной группы на том же этапе на $48,75\%$ и $39,42\%$ соответственно, а к 120 суткам показатели были выше нормальных значений на $7,85\%$. Наилучшие показатели были зарегистрированы в 3 опытной группе. На 7 сутки в этой группе были самые низкие показатели окислительного стресса ($22,35 \pm 2,69$ нмоль/л и $65,95 \pm 3,29$ ед. опт. пл./мл) к 90 суткам исследования данные показатели находились в пределах нормальных значений.

Выводы. Применение коллагена в лечении остеомиелита приводило к нормализации показателей окислительного стресса к 28 суткам исследования, что может свидетельствовать о купировании фазы воспаления и наступлении фазы регенерации мягких тканей. Наиболее эффективным методом в лечении остеомиелита можно считать последовательное применение коротковолнового инфракрасного излучения и коллагена.

SPRS-ТЕРАПИЯ®: КОРРЕКЦИЯ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ. ПАСПОРТ КОЖИ

Вадим Леонидович Зорин, Алла Ивановна Зорина, Артур Александрович Исаев

Институт стволовых клеток человека (Human Stem Cells Institute), Москва, Россия

zorin@hsci.ru

SPRS-терапия® (от англ. Service for Personal Regeneration of Skin) — представляет собой комплекс персонифицированных лечебно-диагностических процедур для восстановления кожи с признаками возрастных и иных структурных изменений.

Основана SPRS-терапия® на технологии использования аутологичных фибробластов кожи пациента — клеточной технологии, разрешенной к применению в эстетической медицине РФ.

На рынок эстетической медицины РФ SPRS-терапия® выведена публичной биотехнологической компанией ПАО «ИСКЧ» в январе 2011 г. Услуга предоставляется через косметологические клиники (сотрудничество с клиниками в 18 городах РФ) и к настоящему времени общее количество пациентов составляет более 1000, при этом более 80% пациентов после терапии кожи одной области обратилось повторно для лечения кожи других областей.

Результаты проведенных исследований позволили заключить, что после трансплантации в кожу

культивированные аутофибробласты полноценно интегрируются в дерму, их биосинтетическая активность сохраняется не менее 12 месяцев. Как следствие наблюдается ремоделирование микроструктуры дермы, выражающееся в увеличении содержания в ней коллагеновых волокон, увеличении гидратации и толщины дермы, усилении функциональной гемомикроциркуляции. Клинически перечисленные изменения в микроструктуре дермы проявляются увеличением упругости, эластичности и толщины кожи, уменьшением количества и глубины морщин. Клинический эффект имеет нарастающий (на протяжении 6–8 месяцев) характер и сохраняется как минимум в течение 2-х лет.

Результаты постмаркетинговых исследований, проведенных через год после применения технологии в клиниках, подтвердили безопасность и клиническую эффективность применения SPRS-терапии® для коррекции возрастных изменений кожи.

SPRS-терапия® включает также:

- банкирование аутофибробластов кожи пациентов (SPRS-банк), представляющий собой матричный банк аутофибробластов кожи пациента, замороженных по специальной технологии и хранящихся в индивидуальных ячейках криохранилища в жидком азоте (эти клетки могут быть разморожены при необходимости и использованы для производства SPRS-препарата);
- определение регенераторного потенциала кожи пациента («Паспорт кожи®»), представляющий собой характеристику регенераторного и пролиферативного потенциалов популяции фибробластов кожи пациента. На основании полученных данных разрабатываются рекомендации, позволяющие врачу-косметологу составить индивидуальную (безопасную и эффективную) программу по уходу за кожей для каждого пациента.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛЯРИЗУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Екатерина Сергеевна Зубкова, Юрий Сергеевич Стафеев, Светлана Сергеевна Мичурина, Михаил Юрьевич Меньшиков

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

cat.zubkova@gmail.com

Применение мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (МСКЖТ) для восстановления функции поврежденных органов находит широкое применение в регенеративной медицине, однако существенно затруднено гетерогенностью их состава, значимо снижающей их жизнеспособность и эффективность их паракринного воздействия на пораженную ткань. Один из современных подходов к преодолению этого препятствия заключается в поляризации клеточных субпопуляций в конкретный фенотип под воздействием цитокинов и других факторов, активирующих рецепторы и передачу сигнала в клетки.

В нашем исследовании мы осуществили поляризацию МСКЖТ факторами, влияющими на воспалительный сигналинг и функциональные свойства клеток, с последующей верификацией их экспрессионного профиля и способности воздействовать на поляризацию макрофагов периферической крови. Оценка, проведенная методом

ПЦР в реальном времени, показала, что клетки, обработанные бактериальным липополисахаридом (ЛПС), интерлейкином-17, фактором некроза опухоли- α (ФНО- α), экспрессируют преимущественно провоспалительные факторы и цитокины, а после обработки полиинозиновой-полицитидиновой кислотой, интерлейкином-4 (ИЛ-4) и α -фетопротеином — противовоспалительные факторы. Макрофаги крови, поляризовали в М1-фенотип в присутствии ЛПС и ИНФ- γ и в М2 -в присутствии ИЛ-4, оценку эффективности поляризации проводили методом проточной цитофлуориметрии по экспрессии маркера М1 фенотипа- CD80, и М2-фенотипа -CD206. Далее мы оценили возможность паракринного воздействия МСКЖТ на поляризацию интактных макрофагов и показали, что кондиционированные среды мезенхимальных стромальных клеток, прединкубированных в присутствии ИЛ-4, вызывают усиление экспрессии CD206, аналогичное наблюдаемому в М2 макрофагах. Среды МСКЖТ, поляризованных в присутствии ЛПС или ФНО- α , повышали экспрессию в макрофагах антигена CD80, аналогичное наблюдаемому в М1 макрофагах. В остальных случаях выраженного паракринного влияния МСКЖТ на поляризацию макрофагов выявлено не было. Таким образом, проведенное нами исследование показало, что поляризация МСКЖТ по провоспалительному или противовоспалительному пути позволяет получить клеточные субпопуляции, оказывающие разнонаправленное модулирующее воздействие на поляризацию макрофагов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-015-00398.

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ — КЛЕТЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Дмитрий Александрович Зубов¹, Роман Геннадьевич Васильев¹, Анжела Евгеньевна Родниченко¹, Владимир Михайлович Оксимец², Алена Васильевна Злацкая¹, Ольга Сергеевна Губарь³, Инна Михайловна Гордиенко⁴, Вероника Евгеньевна Хаджинова¹

¹ Лаборатория прикладных биотехнологий, ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина;

² ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», Киев, Украина;

³ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина;

⁴ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

zoubov77@yahoo.com

У человека костная ткань обладает уникальной способностью к репаративной регенерации без формирования рубцовой ткани при дефектах ограниченного объема. Для восстановления кости в случае ее неспособности к самостоятельной репаративной регенерации существуют различные подходы и методы, имеющую высокую клиническую эффективность: метод distractionного остеогенеза по Илизарову, костная ауто- и аллопластика, имплантация синтетических костнопластических материалов и др. Однако в ряде случаев (переломы вследствие высокоэнергетической травмы, включая боевые ранения; аваскулярные некрозы головки бедренной кости и таранной кости; обширные дефекты критического

размера и т.д.) использование существующих методов восстановления костной ткани имеет низкую клиническую эффективность, либо приводит к неудовлетворительным результатам. Высокая социальная и экономическая значимость проблемы лечения пострадавших с нарушениями репаративного остеогенеза и дефектами костной ткани критического размера делает актуальным разработку новых подходов, основанных на принципах регенеративной медицины, к которым можно отнести использование наноматериалов, клеточную и генную терапию, тканевую инженерию.

Целью исследования было изучение *ex vivo* клеточных и молекулярных механизмов ангио- и остеогенеза с использованием ко-культуры различных типов клеток человека: костномозговые ММСК (КМ-ММСК); периостальные прогениторные клетки (ППК) и эндотелиальные прогениторные клетки из периферической крови (ЭПК), а также оценка клинической эффективности трансплантации разработанного трехмерного тканеинженерного эквивалента кости (3D-ТИЭК) для восстановления дефектов кости критического размера у пострадавших с боевой травмой (VO 2017/078654; PCT/UA2016/000128; ClinicalTrials.gov ID: NCT03103295).

В результате исследований *in vitro* было выявлено, что на уровне мРНК экспрессия генов, участвующих в процессах пролиферации, остеогенной дифференцировки, выживания и ангиогенеза, была обнаружена в некоммитированных монокультурах КМ-ММСК, ППК и ЭПК; монокультуры всех трех клеточных типов экспрессировали факторы роста семейства BMP, необходимые для формирования кости. КМ-ММСК и ППК также экспрессировали ключевые факторы, контролирующие остеогенез: RUNX2, ALP, OCN и SPP1/OPN. Совместное культивирование КМ-ММСК, ППК и ЭПК в различных соотношениях значительно усиливает остеогенез (по экспрессии остеогенных маркеров на уровне мРНК, продукции факторов роста и компонентов внеклеточного матрикса на белковом уровне и в соответствии с изменением иммунофенотипа клеток), что наиболее выражено в группах ЭПК+КМ-ММСК (1:1), ППК+КМ-ММСК (1:1) и ППК+КМ-ММСК (3:1) на 7-е сутки ко-культивирования. ЭПК, ко-культивированные в прямом контакте с КМ-ММСК или ППК, усиливали остеогенные процессы *in vitro*, согласно изученным морфофункциональным свойствам ко-культур. В тоже время КМ-ММСК и ППК стимулировали процессы пролиферации ЭПК (на ранних этапах ко-культивирования), а на поздних этапах усиливали процессы дифференцировки и формирования 3D капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками.

Для изготовления 3D-ТИЭК в качестве скэффолда был использован частично деминерализованный алло- или ксеногенный костный матрикс в комбинации с фибриновым гелем из плазмы крови человека. 3D-конструкция заседалась аутологичными культивированными КМ-ММСК в смеси с ППК и ЭПК. Качественные и функциональные критерии 3D-ТИЭК и его активных компонентов включали: инфекционный скрининг донора и клеточной культуры, иммунофенотипирование (проточная цитометрия), кариотипирование, функциональные тесты (анализ КОЕ, направленная мультилинейная дифференцировка, оценка жизнеспособности и распределения клеток с помощью комбинированного окрашивания 3D-ТИЭК с помощью FDA/PI).

Восстановление костной ткани с использованием 3D-ТИЭК было осуществлено у 50 пострадавших в бою с 52 костными дефектами конечностей различной локализации. Также наш биомедицинский клеточный продукт был использован для лечения аваскулярных некрозов

таранной кости (3 пациента) и головки бедренной кости (5 пациентов). Восстановление дефектов кости наблюдалось через 6 месяцев после операции и оценивалось с помощью рентгенологического исследования. Результаты лечения можно клинически рассматривать, как: хорошие — формирование костной ткани с восстановлением целостности костных сегментов конечности в течение 4–6 месяцев после операции; удовлетворительные — пациенты, у которых произошел частичный лизис эквивалента в зоне трансплантации, но костная ткань сформировалась; а также пациенты, у которых произошла задержка (более 6 месяцев) формирования костной ткани после операции; неудовлетворительные — пациенты, у которых произошел полный лизис 3D-ТИЭК. Гистологический анализ образцов с хорошими результатами лечения, полученных через 3 месяца после операции, выявил формирование незрелой костной ткани.

Разработанный нами биомедицинский клеточный продукт (3D-ТИЭК) показал высокую клиническую эффективность при восстановлении костных дефектов критического размера с высокоэнергетическим механизмом травмы и при лечении аваскулярных некрозов головки бедренной кости и таранной кости. Использование 3D-ТИЭК стимулирует репаративный остеогенез, позволяет восстановить целостность поврежденной кости, сформировать костную ткань в месте дефекта и значительно сократить период реабилитации пациента.

ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СФЕРОИДОВ ИЗ МЕЛАНОЦИТОВ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ IN VITRO

Ирина Михайловна Зурина¹⁻³, Анастасия Алексеевна Горкун¹⁻³, Екатерина Витальевна Джусоева¹, Настасья Владимировна Кошелева^{1,3,4}, Тамара Дмитриевна Колокольцова^{1,3}, Ирина Николаевна Сабурова^{1,3}

¹ ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;

² Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

izurina@gmail.com

Пигментация кожи является результатом синтеза меланина в меланоцитах. Нарушение регуляции этого процесса может привести к потере или усилению пигментации. Разработка и тестирование препаратов для контроля пигментации кожи требует использования простых моделей *in vitro*. В монослойных культурах длительное поддержание функциональной активности клеток затруднено. 3D культивирование клеток в виде сфероидов, напротив, позволяет сохранять их первоначальный фенотип и функциональность. Целью настоящего исследования стало получение и характеристика сфероидов из меланоцитов и сравнение их свойств как модели с коммерческим эквивалентом кожи.

Исследование проводили на культуре меланоцитов кожи человека (CELL Applications) и тканевых эквивалентах кожи Меланодерм (MatTek Corporation). Клетки культивировали в монослое до 4 пассажа, далее помещали

в агарозные планшеты с микролунками (Microtissue, США). Меланодерм культивировали на специальных вставках в планшеты. Культивировали сфероиды и Меланодерм либо в ростовой среде, либо в присутствии фукоксантина (осветляющий агент в косметологии) в течение 7 сут., затем анализировали методами фотометрии, иммуноцитохимии и ПЦР в реальном времени.

В 2D культуре клетки синтезировали меланин, его количество снижалось к 4 пассажу. В 3D условиях меланоциты формировали компактные структуры — сфероиды, в которых количество меланина увеличивалось в течение 7 суток. Экспрессия транскрипционных факторов, регулирующих меланогенез, *gr100* и *MITF* в клетках сфероидов увеличивалась, достигая максимума к 7 суткам. Экспрессия *Sox10* увеличивалась незначительно. Кроме того, была выявлена экспрессия генов фермента меланогенеза тирозиназы (TYR) и рецептора, регулирующего синтез меланина, *MCR1*, которая сохранялась на протяжении 7 суток культивирования. Таким образом, в сфероидах поддерживалась функциональная активность меланоцитов, сравнимая по выраженности с многослойным эквивалентом кожи.

Культивирование сфероидов из меланоцитов и эквивалентов в присутствии фукоксантина приводило к снижению уровня меланина, уменьшению экспрессии *gr100*, *MITF* и TYR, ингибируя созревание меланосом и синтез меланина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 3D система культивирования способна в течение длительного времени поддерживать функциональную активность меланоцитов. Сфероиды могут быть использованы в качестве удобной и доступной тест-системы для исследования эффективности лекарственных препаратов, а также как клеточные модули для тканевой инженерии эквивалентов кожи.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СЕНСИТИЗАЦИЯ АЛЬФА1А-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЕРОТОНИНА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Анастасия Михайловна Иванова, Вадим Игоревич Чечехин, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Наталья Игоревна Калинина

Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ivanovanastasia14@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) входят в состав соединительной ткани и играют ключевую роль в процессах ее репарации, регенерации и поддержании гомеостаза. Данные клетки, секретируя множество паракринных факторов, регулируют множество функций ткани, а также способны дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, адипоциты и миоциты. Ключевыми регуляторами функциональной активности МСК являются серотонин и норадреналин. Ранее мы показали, что норадреналин регулирует функциональную активность МСК, изменяя их чувствительность к норадреналину при помощи феномена гетерологической сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов. При стимуляции сигнального пути β -адренорецепторы/*Gs*-белок/аденилатциклаза/*cAMP* происходит транзитное повышение уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов и их сопряжение с кальций-зависимой внутриклеточной сигнализацией. Как следствие, через 6 часов после стимуляции МСК норадреналином наблюдается повышение чувствительности клеток к этому гормону.

В данной работе мы изучали, как влияют такие нейромедиаторы, как серотонин и норадреналин, на функциональную активность МСК. На первом этапе выяснили, какие изоформы рецепторов норадреналина и серотонина, сопряженные с Gs-белком и синтезом цАМФ, экспрессируются в МСК. Методом ПЦР мы установили, что в МСК экспрессируются мРНК рецепторов серотонина (*HTR6*, *HTR7*), и на уровне белка $\beta 1$ -, $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторы. Для выяснения потенциала регуляции гормональной чувствительности клеток мы стимулировали МСК серотином или норадреналином и через 6 часов анализировали их чувствительность к норадреналину. Мы установили, что серотонин подобно норадреналину транзитивно повышает число клеток, отвечающих на норадреналин. Путем вестерн-блоттинга мы установили, что через 6 часов после стимуляции серотином в МСК повышается уровень экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Также мы показали с помощью ингибиторного анализа и ИФА, что серотонин и норадреналин имеют различные сигнальные механизмы гетерологической сенситизации. В случае норадреналина повышение экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов не связано с активацией CREB и EPAC.

Таким образом, сопряжение адренергических рецепторов с кальциевой сигнализацией за счет повышения уровня экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК при действии серотонина регулируется путем *HTR6*/Gs-белок/аденилатциклаза/cAMP/PKA/CREB и EPAC.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00421 (ингибиторный анализ и кальциевая сигнализация).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ И СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЕ ПАЦИЕНТОВ С ХСН ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ

Оксана Алексеевна Иванова^{1,2}, Елена

Владимировна Игнатьева¹, Татьяна

Александровна Лелявина¹, Виктория Леонидовна

Галенко¹, Маргарита Юрьевна Комарова^{1,3},

Мария Юрьевна Ситникова¹, Анна Александровна

Костарева¹, Алексей Александрович

Сергушичев², Рената Игоревна Дмитриева¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

astroksana@gmail.com

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одним из самых распространенных заболеваний в мире. Одним из следствий ХСН является потеря функциональности мышечной ткани, характеризующееся атрофией, изменением типа миофибрилл, нарушением метаболизма. С другой стороны, физические упражнения являются эффективным методом лечения больных ХСН и повышения толерантности к физической нагрузке. Однако, молекулярные механизмы, ответственные за восстановление скелетной мускулатуры при физических упражнениях остаются неизвестными. Цель работы — исследовать дифференциальную экспрессию генов и сигнальные пути в мышечной ткани пациентов с ХСН, прошедших физическую реабилитацию.

Методы. Биопсии скелетной мускулатуры трех пациентов были собраны до и после 12 недельного периода упражнений (6 шт.). Из образцов была выделена РНК и секвенирована на Illumina MiSeq. Полученные данные были обработаны в R Studio с использованием пакетов DESeq2 для анализа дифференциальной экспрессии генов (ДЕГ) до и после физических упражнений и fgsea для анализа сигнальных путей; контроль частоты ложных открытий (FDR) был 0.1. В качестве клеточной модели регенерации скелетной мускулатуры была выбрана линия миобластов C2C12; мышечная дифференцировка запускалась средой с 2% лошадиной сывороткой; РНК была выделена на d0 и d4 и секвенирована. ДЕГ, найденные в мышечной ткани пациентов с ХСН и клеточной модели сравнивались между собой.

Результаты. Физические тренировки пациентов с ХСН привели к повышению толерантности к физической нагрузке. РНК-секвенирование биопсий выявило 26 сигнальных путей, активированных после физических упражнений. Обнаруженные ДЕГ и пути отвечают за активацию регенерации мышечной ткани, дифференцировку стволовых клеток (MEF2, MyoD, HSP90, IER5), сокращение и релаксацию мышц (MYH7, ACTA1, TNNT1, MYOM1), структуру миофибрилл (ACTB, ACTG1, GSC, FLNC, PLEC, KLHL40), механотрансдукцию (CYR61), функции митохондрий (SLC25A4, NDUFS3, LYRM7, ND6). Клеточная модель для исследования регенерации скелетной мускулатуры C2C12 показала активацию таких же сигнальных путей при запуске дифференцировки; экспрессия ДЕГ, найденных в мышцах пациентов, была также повышена в дифференцированных миобластах C2C12. Данная работа описывает дифференциальную экспрессию генов и сигнальные пути в скелетной мускулатуре пациентов с ХСН, прошедших физическую реабилитацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10178-П.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СИНАПТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ В СПИННОМ МОЗГЕ, В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПОГРАВИТАЦИИ НА ЗЕМЛЕ

Андрей Александрович Измайлов, Максим Сергеевич Кузнецов, Артур Николаевич Лисюков, Ильнара Альбертовна Бикмуллина, Константин Дмитриевич Волков, Филип Олегович Фадеев, Рустем Робертович Исламов

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

gostev.andrei@mail.ru

В недавних исследованиях выявлены значимые морфологические и функциональные изменения в спинном мозге, развивающихся в условиях гипогравитации во время космического полета. Наиболее широко используемой моделью для изучения влияния эффектов невесомости на Земле является модель антиортостатического вывешивания, которая воспроизводит эффекты безопорности для заднего пояса конечностей грызунов.

В настоящем исследовании была изучена экспрессия генов, кодирующих синаптические белки возбуждающих (холинергической [Chat, Chrm1], глутаматергической [Slc17a7, Grin2a]) и тормозных (глицинергической [Gla1, Glyt2]) и ГАМКергической [Gad67, Gabra2]) нейромедиаторных систем в шейном и поясничном отделах спинного

мозга мышей после 30 суток антиорто статического вывешивания и 7 суток последующего восстановления.

Эксперименты проведены на половозрелых мышцах-самцах линии BALB/c. Животные были разделены на 3 группы: «Вывешивание» — мыши, находившиеся в условиях опорной разгрузки задних конечностей в течение 30 суток (n=5); «Восстановление» — мыши после опорной разгрузки задних конечностей в течение 30 суток с последующим восстановлением в течение 7 суток (n=5); «Контроль» — мыши, содержащиеся в стандартных условиях вивария (n=5). Спинной мозг из позвоночного столба выделяли способом гидравлического выдавливания, общую РНК экстрагировали из поясничного и шейного утолщений. Экспрессию генов изучали с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ полученных данных проводили в среде для статистических вычислений R 3.4.4. Для расчета относительной экспрессии целевых генов с учетом значений, полученных для референсного гена Gapdh, применяли метод $\Delta\Delta Ct$.

Количественный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих синаптические белки возбуждающих и тормозных нейромедиаторных систем, не выявил статистически значимых отличий между группами «Вывешивание» и «Восстановление» по отношению к группе «Контроль», как в шейном, так и в поясничном отделе спинного мозга.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о нейропластичности спинного мозга мышей в условиях антиорто статического вывешивания. Кроме того, сравнительный анализ данных настоящей работы с полученными нами ранее результатами об экспрессии генов нейромедиаторных систем в условиях космического полета дает основание полагать, что активность данной группы генов не зависит от безопорности, но может быть связана с другими факторами.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-315-00402.

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФЛЕГМОНЫ ОКОЛОЧЕЛЮСТНОЙ ОБЛАСТИ У КРЫСЫ

Рустем Робертович Исламов¹, Элима Арбиевна Агатиева¹, Ильназ Марсельевич Газизов¹, Саид Сальменович Ксембаев¹, Татьяна Михайловна Андреева¹, Дмитрий Эдуардович Цыплаков¹, Михаил Евгеньевич Соколов¹, Ваге Аршалуйсович Маркосян¹, Тафкиль Такиевич Фаизов², Фарид Вагизович Баширов¹

¹ Кафедра медицинской биологии и генетики, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

elly87@mail.ru

В настоящее время лечение околочелюстных флегмон заключается в обеспечении оттока гнойного отделяемого, санации полости и антибактериальной терапии. Однако, медиастинит, тромбоз мозговых вен, абсцесс головного мозга и сепсис являются частыми осложнениями данной патологии, ведущими к инвалидности и смерти пациентов. В этой связи для разработки новых эффективных способов терапии флегмоны необходимо использовать адекватную экспериментальную модель флегмоны околочелюстной области на животных.

В данной работе околочелюстную флегмону моделировали у крыс-самцов линии Wistar массой 180–220 г. Для этого интактной крысе под надкостницу нижней

челюсти с вестибулярной поверхности в области моляров однократно вводили 0,2 мл перитонеального гнойного экссудата, полученного от другого животного (крысы) в результате моделирования экспериментального перитонита. Микробиологический анализ перитонеального гнойного экссудата обнаружил 2×10^9 микробных тел (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*) в 1 мл. На 3–4 сутки после введения инфицирующего субстрата у подопытных крыс в околоушно-жевательной и поднижнечелюстной областях развивалась флегмона. При вскрытии из созревшей флегмоны выделялось гнойное содержимое, при санации в ране открывалась поверхность кости нижней челюсти. Поверхностные шейные лимфатические узлы увеличены на обеих сторонах. В крови выявлен лейкоцитоз с признаками лимфоцитопении и выраженным моноцитозом. При гистологическом исследовании в регионарных лимфатических узлах установлены признаки острого гнойного лимфаденита. При этом в тимусе и селезенке существенных патологических изменений не обнаружено. По предлагаемому способу околочелюстная флегмона развилась в 100% случаев (у всех 30 подопытных крыс).

Таким образом, предлагаемый способ обеспечивает моделирование околочелюстной флегмоны без предварительного снижения иммунитета лабораторного животного и позволяет получить патогномичную модель околочелюстной флегмоны, которая может быть использована для изучения эффективности и механизмов действия новых способов лечения гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, а именно околочелюстной флегмоны.

Работа выполнена в рамках программы 50 лучших идей для Республики Татарстан в номинации «Молодежный инновационный проект» по проекту «Разработка генно-клеточной терапии гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области».

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ГОЛОВНОГО МОЗГА НА МИНИ-СВИНЬЯХ

Рустем Робертович Исламов¹, Михаил Евгеньевич Соколов¹, Исхандер Азатович Мунасилов¹, Алмаз Талгатovich Салихов¹, Ильфат Фаридович Галяутдинов¹, Ваге Аршалуйсович Маркосян¹, Евгений Сергеевич Ким¹, Дмитрий Александрович Трофимов¹, Арслан Русланович Хамитов¹, Андрей Александрович Измайлов¹, Михаил Самуилович Левин², Зуфар Зуфарович Сафиуллов¹

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

² Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

supermihon@yandex.ru

Важным компонентом в доклинических испытаниях новых методов терапии ишемического инсульта является моделирование ишемических повреждений головного мозга на животных. Однако многочисленные неудачи клинических исследований нейропротекторных, тромболитических и других способов лечения инсульта, прошедших успешные доклинические исследования в моделях ишемии на мелких лабораторных животных, поставили под сомнение возможность прямой трансляции полученных результатов на человека. Поэтому, прежде чем приступить к клиническим испытаниям

новых методов лечения инсульта на людях, является целесообразным использовать крупных лабораторных животных для экспериментальных исследований. Среди известных модельных организмов мини-свиньи считаются наиболее оптимальными животными для доклинических испытаний.

В настоящем исследовании для моделирования ишемии головного мозга методом постоянной окклюзии средней мозговой артерии мы использовали самок мини-свиней ($n=4$) породы вьетнамские вислобрюхие возрастом 4–5 месяцев и весом 25–30 кг. Доступ к головному мозгу осуществляли под ингаляционной анестезией через лобно-височную трепанацию около края глазницы с резекцией скуловой дуги. Под операционным микроскопом среднюю мозговую артерию коагулировали в месте отхождения от виллизиева круга с помощью биполярного пинцета.

В послеоперационном периоде в течение недели анализ поведенческих тестов выявил двигательные и чувствительные нарушения в задних конечностях. Через 7 суток после моделирования инсульта подопытных животных подвергали эктаназии, головной мозг выделяли из черепной коробки для морфологического исследования. Макроскопический и микроскопический анализ головного мозга обнаружил очаговый ишемический инфаркт мозга, затрагивающий теменную и височные доли. Таким образом, результаты поведенческих тестов и морфологического исследования выявили характерные и воспроизводимые морфо-функциональные нарушения головного мозга у мини-свиней через неделю после окклюзии средней мозговой артерии.

Разработанный нами способ моделирования ишемического инсульта головного мозга у мини-свиньи позволяет получить инфаркт мозга ограниченного объема в заданной области и может быть использован для доклинических исследований новых методов терапии ишемического инсульта с последующей трансляцией на клинические испытания.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-75-10030.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ В СОЧЕТАНИИ С ЭПИДУРАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЕЙ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СПИННОГО МОЗГА МИНИ-СВИНЬИ С КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМОЙ

Рустем Робертович Исламов, Филип Олегович Фадеев, Фарид Вагизович Баширов, Ваге Аршалуйсович Маркосян, Михаил Евгеньевич Соколов, Андрей Александрович Измайлов, Мария Александровна Давлеева, Роман Васильевич Шевченко, Тагир Фархатович Миникаев, Дамир Ринатович Ибрагимов, Анастасия Тимуровна Халитова, Юлия Александровна Калистратова

Кафедра медицинской биологии и генетики, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

philip.fadeyev@gmail.com

На сегодняшний день эффективных методов терапии травмы спинного мозга (ТСМ) не существует. Поиск новых способов лечения ТСМ и их испытания на крупных лабораторных животных являются одной из актуальных

проблем, как неврологии, так и регенеративной медицины. В данной работе изучена эффективность клеточно-опосредованной генной терапии (ГТ) в сочетании с эпидуральной электростимуляцией (ЭС) у мини-свиней после моделирования ТСМ.

Подопытным мини-свиньям с ТСМ на уровне Th8 ($n=2$) через 4 ч после операции интратекально вводили генно-модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, одновременно продуцирующие рекомбинантные сосудистый эндотелиальный фактор роста, глиальный нейротрофический фактор и нейрональную молекулу клеточной адгезии. ЭС начинали через 2 недели после нанесения нейротравмы и проводили выше места повреждения на уровне С5 для стимулирования роста аксонов через эпицентр травмы и ниже — на уровне L2 для возбуждения генераторов центрального паттерна. Для ЭС использовали электростимулятор Digitimer DS7A, сила тока варьировала от 7 мА до 15 мА, частота 25–30 Hz. Контрольным животным после моделирования ТСМ ($n=2$) интратекально вводили физиологический раствор.

Через 2 месяца после моделирования ТСМ анализ кинематики суставов во время ЭС выявил, что объем движений в голеностопном суставе подопытных мини-свиней приблизился к значениям интактных животных. Поведенческий тест, оценивающий состояние мини-свиней после ТСМ грудного отдела, также выявил лучший показатель восстановления двигательной функции у подопытных животных. Электрофизиологическое исследование *m.soleus*, показало, что у контрольных животных моторный (M) ответ имел несколько фаз, а рефлекторный (H) ответ отсутствовал. В терапевтической группе M- и H-ответы имели стандартную форму. Морфометрический анализ объема патологических полостей в сером веществе спинного мозга выявил большую сохранность ткани у подопытных мини-свиней по сравнению с контрольными. Иммунофлуоресцентный анализ выявил меньшее количество Caspase3⁺-клеток и больший уровень экспрессии Hsp27, синаптофизина и PSD95 у подопытных мини-свиней.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о положительном эффекте ЭС в сочетании с ГТ на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у мини-свиней с ТСМ и могут явиться основой для разработки клинического протокола лечения ТСМ у человека с помощью комбинированной электро- и генной терапии.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 16-15-00010.

ПРИМЕНЕНИЕ 3D-ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ В DRUG DISCOVERY

Мариами Георгиевна Кавиладзе

Первый МГМУ им. Сеченова, Москва, Россия

mariam-kaviladze@mail.ru

Трехмерные культуры опухолевых клеток преодолевают ограничения традиционно используемых однослойных культур и воссоздают такие основные характеристики опухолей, как пространственные градиенты кислорода, факторов роста и метаболитов и наличие некротических, гипоксических, покоящихся и пролиферативных клеток.

Целью исследования было доказать преимущество 3D-модели над 2D-моделью с целью дальнейшего интегрирования *in vitro* модели опухолевых сфероидов в схему разработки противораковых лекарственных средств и использования первичных опухолевых клеток

в исследованиях скрининга лекарств для реализации персонифицированного лечения рака.

Материалы и методы. В рамках исследования были получены многоклеточные сфероиды, сгенерированные из суспензии отдельных клеток иммортализованной клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в сыворотке. Микрокапсулы с мультিকлеточными опухолевыми сфероидными (МОС) инкубировались в 24-луночных планшетах с Метотрексатом в течение 48 часов. В качестве контроля использовали монослойную культуру MCF-7 (105 кл. в лунке). Количественная оценка выживших клеток производилась с помощью красителя трипанового синего в камере Фукса-Розенталя.

Результаты. При концентрации Метотрексата 100 нМ выживаемость жизнеспособных клеток в контроле была вдвое меньше по сравнению с таковой для МОС. Была также произведена оценка цитотоксического действия Капецитабина в зависимости от размера МОС. При концентрации Метотрексата 100 нМ количество живых клеток составило 65 и 88% для сфероидов размером 150 и 300 мкм, соответственно, в то время как в контроле это значение составило только 35%.

Выводы. По сравнению с монослойными культурами раковые клетки в трехмерных сфероидных культурах демонстрируют большую устойчивость к цитотоксическим препаратам, причем цитотоксическое действие Метотрексата уменьшается с увеличением размера МОС. В связи с этим, трехмерные опухолевые модели представляют собой ценный «инструмент» для исследования рака в контексте с drug discovery.

РЕЗОРБИРУЕМАЯ БИОКЕРАМИКА В СИСТЕМЕ $Ca_2P_2O_7$ – $Mg_2P_2O_7$, ПОЛУЧЕННАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТЕРЕОЛИТОГРАФИЧЕСКОЙ ПЕЧАТИ С ЗАДАНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ПОРОВОГО ПРОСТРАНСТВА

Гияна Константиновна Казакова¹, Татьяна Викторовна Сафронова², Ирина Ивановна Селезнева³, Владимир Валентинович Зайцев⁴, Снежана Алексеевна Тихонова¹

¹ Факультет наук о материалах, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

⁴ ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

gilyanakk@gmail.com

В реконструктивно-восстановительной хирургии и ортопедии необходимы костные имплантаты нового поколения, предназначенные для ремоделирования кости в области дефекта сложной формы.

Учитывая, что процесс ремоделирования зависит от непростого сигнального пути между остеобластами, остеокластами и контроля механизмов гомеостаза (дифференцировка и т. д.), и неорганическая часть человеческой кости состоит в основном из гидроксипатита (HAP : $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) и витлокита (WH : $Ca_{18}Mg_2(HPO_4)_2(PO_4)_{12}$). При создании костных имплантатов неорганической природы возникает большой интерес к материалам на основе биорезорбируемых фаз, где катион магния в купе с конденсированными фосфат-ионами может повтoрять

раннюю стадию регенерации кости за счёт стимулирования остеогенной дифференцировки, запрещения остеокластической активности и превращения в механически улучшенные ткани гидроксипатита (HAP)-лео при непрерывном поступлении. Тем самым повысить предел и скорость резорбируемости можно за счёт введения в состав фаз в системе $Ca_2P_2O_7$ – $Mg_2P_2O_7$.

Придать же материалу остеиндуктивность, способность к адгезии и соединению остеогенных клеток, удержанию процессов их разрастания и дифференцировки, можно за счёт шероховатости поверхности и пористости. Так, с помощью современной аддитивной технологии в минимальные сроки получается физический трёхмерный объект практически любой архитектуры из компьютерной модели, выполненной с использованием систем автоматизированного проектирования. Данный подход при получении резорбируемой биокерамики в системе $Ca_2P_2O_7$ – $Mg_2P_2O_7$ пригоден для создания остеокондуктивного макропористого материала, обладающего достаточной прочностью и способного поддерживать прорастание в имплантат новообразованной кости, благодаря специальной архитектуре каркаса, в которой до 80% всего объёма — связанные поры.

Для биомедицинских применений проведены токсикологические исследования полученного материала для определения его безопасности (цитотоксичности), исследована биорезорбируемость, остеокондуктивность при внедрении прототипа в дефект костной ткани лабораторных животных. В результате данная разработка позволяет создавать костные имплантаты для лечения дефектов костной ткани в виде неорганической основы конструкций персонализированной костно-тканевой инженерии.

Работа выполнена при поддержке проекта № 19-38-9027419 Российского Фонда Фундаментальных Исследований.

ПРИМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ФРАКЦИИ В ПРЕФАБРИКАЦИИ ПЕРФОРАНТНЫХ ЛОСКУТОВ

Илья Борисович Казанцев¹, Александр Иванович Цуканов¹, Владимир Владимирович Иванов², Ольга Александровна Кайдаш², Анна Сергеевна Жевняк³

¹ Томская Областная клиническая больница, Томск, Россия;

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

³ Томское Областное патолого-анатомическое бюро, Томск, Россия

ibkmdoctor@gmail.com

В последние годы в литературе появляется множество данных о влиянии стромально-васкулярной клеточной фракции (СВКФ) на выживаемость микрохирургических кожных лоскутов в эксперименте, путем паракринной стимуляции неоангиогенеза.

Цель: создать методологию применения стромально-васкулярной клеточной фракции в префабрикации тонких перфорантных лоскутов крысы в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на половозрелых самцах белой лабораторной крысы линии Wistar (n=36). Анестезия производилась с помощью наркозного аппарата для животных с использованием фторотана. У донора билатерально иссекали ингуинальный жир (3 гр.) Из полученного материала с помощью стандартного ручного протокола по выделению СВКФ получали клеточную

взвесь. Выполняли подъем перфорантного лоскута боковой грудной артерии. Опытной группе (n=18) выполняли хирургическое удаление подкожной жировой клетчатки до сосочкового слоя дермы на половине лоскута, убирая сосуды соседних перфорасом. В полученный лоскут вводили клеточную взвесь. В контрольной группе (n=18) лоскут вводили физиологический раствор. Фотографирование производили на 3-6-9-11 сутки. Затем животные выводились из эксперимента, а полученные образцы лоскутов отправляли на гистологические и иммуногистохимические исследования (маркеры CD34 QBEnd/10, SMA 1A4). Оценивали выживание зон кровоснабжения лоскутов, сосудистый рисунок методом диафаноскопии, а также неоваскуляризация при микроскопии перпаратов.

Результаты. При визуальном осмотре определялось полное отсутствие зон некроза мягких тканей у животных, интраоперационно которым вводили СВКФ. У контрольной группы отмечали появление и прогрессирование некроза тканей в отдаленных от основного перфорантного сосуда зонах, начиная с 4 суток. При подъеме лоскута при диафаноскопии, у опытной группы отмечали бурный сосудистый рост (сосуды 3 и 4 порядка) в тонком лоскуте. В контрольной группе — отмечали полное визуальное отсутствие сосудов. При гистологическом исследовании в образцах лоскутов с СВКФ отмечали густую сосудистую сеть в дерме, состоящую из молодых сосудов на 4 сутки и сети сосудов разной степени зрелости на 10–11 сутки.

Выводы. Применение СВКФ для ангиогенеза в тонких микрохирургических перфорантных лоскутах имеет большое практическое значение, открывая новые возможности в префабрикации и комплексов тканей.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ВОЛОСЯНОГО Фолликула ЧЕЛОВЕКА: ПЕРСПЕКТИВЫ ПЕРЕХОДА ОТ ТРЕХМЕРНЫХ ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ КУЛЬТУР К ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Екатерина Павловна Калабушева^{1,2}, Элина Сергеевна Чермных^{1,2}, Андрей Александрович Рябинин^{1,3}, Екатерина Андреевна Воротеяк¹⁻³

¹ Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² НИИ Трансляционной медицины, РНИМУ им. Пирогова, Москва, Россия;

³ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kalabusheva.e@gmail.com

Современные подходы тканевой инженерии направлены на полную или частичную реконструкцию органов *in vitro*, пригодных для фундаментальных исследований, фармацевтических разработок или заместительной терапии. Волосяной фолликул (ВФ) востребован данной научной областью в качестве модельного объекта благодаря высокому регенеративному потенциалу. В нашей лаборатории разрабатываются методы реконструкции зачатка ВФ, полученных из первичных клеток человека или клеток с индуцированной плюрипотентностью, а также оптимизируются пути трансплантации органоидов в человеческую кожу на модельных гуманизированных животных.

Разработанный метод получения развивающегося зачатка ВФ основан на способности первичных постнатальных кератиноцитов человека и мезенхимных клеток ВФ, дермальной папиллы, к самоорганизации в трехмерных культуральных условиях в присутствии гиалуроновой кислоты. Полученные конструкции демонстрируют

признаки раннего фолликулогенеза — активацию каскада WNT — и более поздних событий, таких как переключение экспрессии интерфолликулярных маркеров на профолликулярные у эпидермальных кератиноцитов. Условия *in vitro* препятствуют дальнейшему развитию ВФ из органоидов, полученных из первичных клеток кожи человека. Для коррекции культуральных ограничений морфогенетического потенциала, были разработаны и адаптированы протоколы дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток человека в направлении эпидермальных кератиноцитов и клеток дермальной папиллы ВФ, позволяющие получить клетки, соответствующие более ранней стадии онтогенеза.

Трансплантация исследуемых органоидов в коллагеновых матриксах высокой жесткости подкожно лабораторным животным с иммунодефицитом приводила к формированию фолликуло-подобных структур. Для оценки перспективы заместительной терапии были разработаны модели гуманизированных лабораторных животных: мышам с иммунодефицитом на спину пересаживали фрагменты неонатальной крайней плоти и участки скальпа взрослого человека. В обоих случаях отмечали успешную приживаемость трансплантатов с сохранением пролиферации в коже человека, таким образом, данные модели могут успешно применяться для анализа приживаемости тканеинженерных конструкций.

Проведенные работы охватывают все этапы исследования и получения органоидных органоидов ВФ и определяют перспективы использования данных конструкций в биомедицинских целях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-00204.

ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И КОЛЛАГЕНОВ I И III ТИПА ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ КОЖНОЙ РАНЫ НА ЖИВОТЕ И СПИНЕ КРЫС

Евгения Юрьевна Кананыхина, Галина Борисовна Большакова, Татьяна Владимировна Шмакова

ФГБНУ НИИ морфологии челоосека, Москва, Россия

e.kananykhina@gmail.com

Поврежденные органы млекопитающих, как правило, заживают с образованием соединительно-тканного рубца, который восполняет только целостность органа без полноценного восстановления его кровоснабжения, структуры и функций. Крайне важным представляется поиск способов смещения процесса рубцового заживления кожи в сторону полноценной регенерации.

Механизмы, лежащие в основе безрубцового восстановления кожи до конца не изучены, этот процесс связывают, в частности, с низким или отсутствующим воспалительным ответом, усилением коллагеногенеза и повышенной экспрессией матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (TIMP).

Целью нашего исследования было изучение динамики состава основных белков матрикса регенерата — коллагена I и III типа и экспрессии генов молекул, непосредственно влияющих на его формирование — MMP2, MMP9 и TIMP1, TIMP2 на моделях с различным исходом репарации.

Исследование проведено на новой разработанной нами модели заживления кожи после эксцизионной раны диаметром 16 мм на животе крысы с образованием минимального рубца. Группой сравнения являлись крысы с раной на спине. Материал брали из области повреждения на 7, 14, 20, 30, 60 сутки после операции и стандартно проводили. Срезы окрашивали пикросириусом

красным. Экспрессию генов матриксных белков коллагена I и коллагена III (Col1, Col3) и матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (гены *Mmp2*, *Mmp9*, *Timp1*, *Timp2*) определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

По сравнению со стандартной моделью кожной раны на спине крысы, заживление полнослойной раны на животе имеет следующие особенности:

- отношение коллагена I к III к 60 суткам после операции не отличается от интактного контроля;
- соотношение *Mmp9/Timp1* в 2–3 раза выше с 3 по 14 постоперационные сутки в коже живота по сравнению со спиной;
- быстрый подъем и последующее достижение контрольного уровня экспрессии *Mmp9*, *Mmp2*, *Timp1* и *Timp2* к 14 суткам после травмы.

Таким образом, нами впервые показано, что заживление раны на животе взрослой крысы по функциональным и молекулярным характеристикам ближе к полноценной регенерации, чем рубцовая репарация кожи спины.

ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ КАСПАЗЫ-2 КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЕЁ ФУНКЦИИ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Анастасия Александровна Капуста¹, Николай Викторович Первушин¹, Борис Давидович Животовский^{1,2}, Гелина Сергеевна Копейна¹

¹ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

nastyakapusta@gmail.com

Апоптоз — генетически регулируемый тип гибели клеток, необходимый для нормального протекания эмбриогенеза и поддержания гомеостаза тканей. Важными участниками активации и развития апоптоза являются каспазы, относящиеся к семейству цистеиновых протеаз. Наиболее эволюционно консервативным представителем данного семейства является каспаза-2, участвующая как в запуске, так и усилении апоптоза при повреждениях ДНК и воздействии других стрессовых стимулов. Известно, что каспаза-2 активируется в составе высокомолекулярного комплекса PIDDosome, в то же время имеются данные о том, что каспаза-2 может активироваться по PIDDosome-независимому пути. Однако молекулярный механизм альтернативной активации каспазы-2 до сих пор неясен.

Для выявления потенциальных партнеров каспазы-2, необходимых для её активации, нами был проведен масс-спектрометрический анализ, показавший среди партнеров каспазы-2 наличие белка р62, который связывает убиквитин и является рецептором аутофагии. Кроме того, были обнаружены Е3-лигаза и убиквитин, в связи с чем нами выдвинуто предположение, что каспаза-2 подвергается убиквитинилированию.

В клетках карциномы яичника Саov-4 была индуцирована гибель ДНК-повреждающими препаратами цисплатином и доксорубицином. С помощью метода Вестерн-блота была детектирована активация каспазы-2, о чём свидетельствовало накопление ферментативно активных форм каспазы-2. При сочетании цисплатина или доксорубицина с протеасомным ингибитором MG-132 наблюдалось накопление активных форм каспазы-2 без существенного падения уровня проформы, что коррелировало с усилением активации

каспазы-3 и расщеплением субстрата каспаз — белка ПАРП (Поли(АДФ-рибоза)-полимераза).

На эмбриональных клетках почек НЕК293Т с помощью метода ко-иммунопреципитации было показано, что каспаза-2 подвергается убиквитинилированию при обработке клеток доксорубицином, которое усиливалось при комбинаторной обработке клеток препаратом MG-132. При этом, вероятно, такое убиквитинилирование приводит к р62-опосредованной протеасомной или аутофагосомной деградацией, поскольку при оверэкспрессии р62 в клетках Саov-4 наблюдалось уменьшение количества проформы каспазы-2. Действительно, полученные данные свидетельствуют о том, что генотоксический стресс вызывает убиквитинилирование каспазы-2, что стимулирует её протеасомную и, возможно, аутофагосомную деградацию по р62-зависимому пути.

Работа выполнена за счёт гранта Российского научного фонда № 17-75-20-102.

СОЗДАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОГО «ВЫКЛЮЧЕНИЯ» РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА, ГЕНОВ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ГЕНОВ БЕЛКОВ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ МНОГООБРАЗИЕМ СПЛАЙС-ФОРМ

Максим Николаевич Карагаур^{1,2}, Данияр Таалайбекович Дыйканов^{1,2}, Мария Никитична Скрябина², Карина Дмитриевна Рысенкова², Екатерина Владимировна Сёмина^{2,3}, Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ НИИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

danidy@inbox.ru

Технологии редактирования генома позволяют изучать роль отдельных генов и функциональных элементов генома в реализации физиологических свойств и развитии патологических состояний клетки. Наиболее удобным подходом для решения такого рода задач является «выключение» целевых генов. Обычно этого можно достичь использованием нуклеазы Cas9 в комплексе с одной единственной направляющей РНК (gRNA). Однако огромное количество клеточных функций находится под контролем сложной системы регуляторных факторов, не связанных с каким-то одним кодирующим геном. При этом «выключение» регуляторных областей генома, генов некодирующих РНК (например, одной или нескольких микроРНК) и генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм, т.е. вырезание определенного фрагмента целевой ДНК, представляет собой существенную проблему, поскольку требует одновременной экспрессии нескольких gRNA.

По данным литературы одной из возможных схем одновременной экспрессии двух gRNA в одной генетической конструкции является клонирование обеих gRNA, разделенных tРНК, под контроль одного промотора. В таких системах транскрибируемая гибридная РНК расщепляется эндогенными эукариотическими РНКазами Р и Z на отдельные gRNA и tРНК. Данная схема экспрессии gRNA реализована и в данной работе. Собранный генетическая конструкция рХ458-2g кодирует остовы

gRNA, разделенные tPHK (Mus_musculus_tRNA-Gly-GCC-2-4). Для клонирования спейсеров gRNA генетическая конструкция содержит сайты эндонуклеаз рестрикции S-подтипа: BbsI и BsaI. Нами показано, что одновременная экспрессия двух gRNA в одном векторе обеспечивает более эффективное вырезание фрагмента ДНК (эффективность ~ 50%), чем при использовании смеси двух векторов, каждый из которых кодирует единственную gRNA (эффективность ~ 10%).

В дальнейшем планируется подтвердить эффективность полученной генетической конструкции для вырезания генов специфических микроРНК и «выключения» генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований — проект № 19-29-04172. В работе были использованы коллекции клеток и генетических конструкций, собранных и сохраняемых в рамках проекта «Ноев ковчег», и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

БИЦИСТРОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ, КОДИРУЮЩАЯ МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА, СТИМУЛИРУЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА

Максим Николаевич Карагаур^{1,2}, Александра Ивановна Ростовцева², Вадим Юрьевич Балабаньян², Полина Сергеевна Климович³, Екатерина Владимировна Семина^{2,3}, Дмитрий Викторович Стамбольский¹

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

s.rostov.94@mail.ru

Повреждения периферических нервов являются одной из значимых причин инвалидизации. Недостаточная эффективность существующих терапевтических подходов, актуализирует поиск и создание новых терапевтических подходов и лекарственных препаратов, которые были бы способны поддерживать экспрессию нейротрофических факторов на уровне, необходимом для выживания поврежденных нейронов и стимуляции роста нейритов. Несмотря на всю перспективность, применение клеточных препаратов в настоящее время затруднено, что стимулирует предпочтительное развитие генно-терапевтических подходов. В рамках этой концепции нами ранее был создан и исследован генно-терапевтический препарат, содержащего ген мозгового нейротрофического фактора (BDNF). В настоящей работе мы представляем бицистронный невирусный вектор, кодирующий последовательности кДНК двух факторов: BDNF, который стимулирует выживание поврежденных нервных клеток и рост нейритов, и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), который способствует очищению области травмы от фибрина, прорастанию нейритов, а также активирует резидентных факторов роста.

Биологическая активность полученной генетической конструкции была подтверждена в исследованиях *in vitro* (стимулировала рост нейритов в культурах нейробластомы

Neuro2a и чувствительных ганглиев мыши) и *in vivo* (на модели травмы периферического нерва). Исследование диссеминации плазмиды из места введения показало, что плазмидная ДНК способна распространяться по организму, особенно после повторных инъекций, однако, эктопической экспрессии закодированных в ней белков обнаружено не было. Исследования острой и хронической токсичности, канцерогенности подтвердили безопасность созданной генетической конструкции, а исследования ее стабильности показали практически полное отсутствие ее деградации в течение двух лет при температуре хранения +4–6 °С. Способность влиять на патогенетические звенья процессов реиннервации и нейритогенеза, действенность, безопасность и стабильность — все это делает бицистронную генетическую конструкцию, кодирующую BDNF и uPA, одним перспективных генно-терапевтических препаратов для лечения патологий периферической и центральной нервной системы.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований — проект № 18-015-00535. В работе были использованы коллекции клеток и генетических конструкций, собранных и сохраняемых в рамках проекта «Ноев ковчег», и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА И УРОКИНАЗНОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ PROOF-OF-CONCEPT

Максим Николаевич Карагаур^{1,2}, Александра Ивановна Ростовцева², Светлана Александровна Литвинова³, Сталик Станиславович Джауари², Вадим Юрьевич Балабаньян², Екатерина Владимировна Семина^{2,4}, Максим Валерьевич Мнихович⁵, Анастасия Юрьевна Ефременко^{1,2}, Дмитрий Викторович Стамбольский⁶

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия;

⁴ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

⁵ НИИ морфологии человека, Москва, Россия;

⁶ Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

stalik.djauari@yandex.ru

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по геморрагическому типу составляют около 15% всех инсультов, и ежегодно в России регистрируют более 40 тысяч случаев кровоизлияний в мозг. Эффективных терапевтических подходов для уменьшения области поражения и стимуляции восстановления поврежденного мозга при данной патологии на сегодняшний день не существует.

Исходя из патогенеза развития заболевания, одними из перспективных препаратов для снижения объемов повреждения при геморрагическом инсульте могли бы быть нейротрофические факторы и/или активаторы плазминогена, которые способствовали бы лучшему выживанию

поврежденных нейронов и восстановлению нервных связей. Ранее нами была создана генетическая конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор (BDNF) и урокиназный активатор плазминогена (uPA) человека, которая стимулировала восстановление нервных волокон на модели травмы периферического нерва. Схожесть патогенеза травмы нерва и ОНМК позволила предположить, что эта генетическая конструкция может быть эффективна и при лечении ОНМК. Однако, доставка генов BDNF и uPA, как в виде плазмиды, так и в составе лентивирусных частиц, в клетки в очаге геморрагического инсульта оказалась неэффективной. Для проверки гипотезы о принципиальной возможности BDNF и uPA стимулировать выживание и регенерацию нервной ткани в очаге ОНМК по геморрагическому типу (in vivo модель на крысах) была использована кондиционированная культуральная среда, собранная с клеток HEK293, экспрессирующих BDNF и uPA. Предварительные результаты исследования продемонстрировали способность такой среды снижать тяжесть повреждения головного мозга: в экспериментальной группе наблюдали менее тяжелые неврологические нарушения (Stroke-index McGrow) и меньшую площадь повреждения головного мозга (окраска срезов мозга по Нисслю).

Таким образом, мы показали перспективность использования комбинации BDNF и uPA для восстановления мозга при ОНМК по геморрагическому типу на модели in vivo. Планируются дальнейшие углубленные исследования для изучения механизмов наблюдаемых эффектов и оптимизация методов доставки генотерапевтического препарата, кодирующего эти факторы, в ткани мозга.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований — проект № 18-015-00535. В работе были использованы коллекции клеток и генетических конструкций, собранных и сохраняемых в рамках проекта «Ноев ковчег», и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Павел Анатольевич Каралкин¹, Ирина Константиновна Свиридова¹, Валентина Александровна Кирсанова¹, Сурая Абдулаевна Ахмедова¹, Ярослав Дмитриевич Шанский¹, Елизавета Константиновна Нежурина¹, Ирина Александровна Замулаева², Надежда Николаевна Волченко¹, Наталья Сергеевна Сергеева¹, Андрей Дмитриевич Каприн³

¹ МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава, Москва, Россия;

² МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава, Обнинск, Россия;

³ ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава, Москва, Россия

pkaralkin@gmail.com

Регенеративный потенциал стромальной васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани (ЖТ) как источника прогениторных клеток на сегодняшний день не вызывает сомнений. Терапевтические эффекты при этом во многом обусловлены способностью клеток СВФ продуцировать факторы роста, цитокины и регуляторные пептиды. В то же время, репаративные или иммуномодулирующие эффекты паракринных факторов неизменно сопряжены

с риском стимуляции предрасполагающих опухолевых клеток в организме в силу значительного сходства регуляторных каскадов в механизмах регенерации и онкогенеза. Так, в ряде исследований было показано, что паратуморальное введение клеток СВФ приводит к стимуляции пролиферации клеток опухолей, а также способствует развитию метастазирования, неоваскуляризации и иммуносупрессии.

Целью данной работы являлась сравнительная характеристика культур мультipotентных стромальных клеток (МСК), выделенных из СВФ ЖТ условно здоровых доноров и больных раком молочной железы (РМЖ). Образцы ЖТ доноров и больных РМЖ I-II стадий получали в ходе оперативных вмешательств из областей, максимально удаленных от молочной железы. Первичные культуры МСК выделяли путем ферментативной дезагрегации ЖТ. На этапах культивирования оценивали морфотип клеток, их пролиферативную активность, экспрессию поверхностных маркеров, цитокератинов (ЦК), виментина и гладкомышечного актина, эффективность колониеобразования и пластичность в направлении адипо- и остеодифференцировки.

Большинство культур МСК, выделенных из ЖТ доноров и больных РМЖ практически не различались по морфологическим и функциональным свойствам. Лишь в одной культуре наблюдалось постепенное замещение к 4 пассажу исходных фибробластоподобных CD90⁺CD105⁺ клеток кубоидальными клетками с крупными ядрами. Эти клетки демонстрировали высокий индекс пролиферации, эпителиальный фенотип (CD326⁺, общий ЦК⁺, ЦК7⁺) и были идентифицированы цитологами как раковые. Колонии раковых клеток последовательно перевивали подкожно иммунодефицитным мышам BALB/c Nude, что приводило к стабильному росту частоты опухолеобразования в каждой новой генерации.

Таким образом, на этапах принятия решения о проведении клеточной аутопересадки МСК СВФ у больных раком необходимо учитывать вероятность наличия в препаратах дормантных опухолевых клеток из микрометастазов, способных инициировать рецидив онкологического процесса. Полученные результаты будут обсуждены с позиций имеющихся рекомендаций международных сообществ специалистов в области регенеративной медицины.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КРОЛИКА В ПРИСУТСТВИИ FGF

Ирина Сергеевна Кашапова, Елена Сергеевна Щукина, Глеб Юрьевич Косовский

Отдел биотехнологий, ФГБНУ НИИПЗК, г./п Родники, МО, Россия

i-kashapova@rambler.ru

Наиболее перспективным объектом тканевой инженерии являются мезенхимные стволовые клетки (МСК) в связи с их мультipotентностью и возможностью получения из аутологичных источников (Г.Ю. Косовский, 2007). Одной из проблем клеточной биотехнологии является разработка методов культивирования МСК в условиях, не оказывающих негативного влияния на биологические характеристики клеток этого типа и способствующих повышению терапевтического потенциала МСК.

Мы провели сравнительный анализ пролиферативного и дифференцировочного потенциала МСК в культуре в условиях присутствия или отсутствия в культуральной среде FGF (Fibroblast Growing Factor), часто используемого

при культивировании МСК для поддержания их физиологических свойств *in vitro* (А.Г. Полешко и др., 2014). Взаимодействие FGF с рецепторными белками приводит к активации различных путей внутриклеточной сигнализации, связанных с процессами пролиферации, дифференцировки, межклеточными взаимодействиями, прохождением клеток по клеточному циклу.

МСК костного мозга (КМ) кролика 3 пассажа выделяли по методу д.б.н. Косовского Г.Ю. (Г.Ю. Косовский, 2009) и культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) (ПанЭко, Россия) или Osteogenic Differentiation Medium (ODM) (Biological Industries, США) (поскольку способность к остеогенной дифференцировке *in vitro* является ключевым параметром, отражающим функциональную активность МСК КМ (Г.Ю. Косовский и др., 2014) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров FBS (HyClone, США), а также с внесением рекомбинантного FGF человека (Sigma, США) в концентрации 10 нг/мл среды или без FGF. Популяции МСК условно разделили на 4 группы: клетки 1 группы (контрольной) культивировали в DMEM/F12 без FGF, 2 — в DMEM/F12 с FGF, 3 — в ODM без FGF, 4 — в ODM с FGF. Время культивирования 14 дней. Препараты фиксировали с использованием 4% формалина и 70% этилового спирта и окрашивали ализариновым красным (Sigma, Германия).

МСК 1 и 3 группы достигали монослоя на третьи сутки культивирования, тогда как во 2 и 4 группах монослой формировался уже через 24 ч.

На 14 сутки, в 1 группе клетки имели преимущественно кубоидальную и полигональную форму, морфологические изменения соответствовали началу остеогенной дифференцировки, тогда как подобные изменения во 2 и 3 группах отмечены на 9 день, а в 4 — на 5. Крупные плотные очаги кальцификации во 2 и 3 группах выявлены на 14 день эксперимента, а в 4 — на 9.

Таким образом, рекомбинантный FGF человека способствует пролиферации и остеогенной дифференцировке МСК КМ кролика.

ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ СПЕКАНИЕ: ОТ МИКРОЧАСТИЦ ДО 3D СТРУКТУР

Любовь Андреевна Киляшова¹, Татьяна Сергеевна Демина¹⁻³, Никита Владимирович Минаев⁴, Татьяна Николаевна Попырина^{1,2}, Семен Николаевич Чурбанов^{3,4}, Светлана Анатольевна Минаева⁴, Christian Grandfils⁵, Татьяна Анатольевна Аكوпова², Петр Сергеевич Тимашев^{3,4}

¹ Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия;

² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия;

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

⁴ Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;

⁵ Interfaculty Research Centre on Biomaterials (CEIB), University of Liège, Liège, Belgium

detans@gmail.com

Поверхностно-селективное лазерное спекание (СПЛС) является одним из методов аддитивных технологий и позволяет получать трехмерные матрицы заданной архитектуры для регенеративной медицины за счет поглощения ИК лазерного излучения компонентом,

нанесенным на поверхность частиц. При этом разогрева объема микрочастиц не происходит, а плавление их поверхностного слоя обеспечивается передачей тепла от нанесенного на поверхность компонента, чувствительного к используемому излучению.

Цель работы заключалась в исследовании влияния химической структуры поверхностного слоя микрочастиц из полилактида на параметры получения из них трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания.

Микрочастицы для СПЛС получали методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода, в которых дисперсная фаза состояла из раствора поли(L,L-лактида) (ММ 100 кДа) в дихлорметане, а в качестве дисперсионной среды использовали раствор хитозана (ММ 350 кДа, СА 0.14) или его сополимера с олиго(L,L-лактидом) (ММ 5 кДа) и коллагеном (тип I). Состав дисперсионной среды должен обеспечивать стабилизацию границы раздела фаз в процессе перехода эмульсии в суспензию твердых микрочастиц. По сравнению с немодифицированным хитозаном, использование его амфифильного сополимера с олиголактидом и коллагеном позволяет повысить общий выход микрочастиц с 47 до 73 мас.%. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии в обоих случаях микрочастицы обладают сферической формой и однородной морфологией поверхности. Качественный анализ химической структуры поверхности, проведенный с помощью селективного по отношению к аминокетонам хитозана и белкам флуоресцентного красителя флуоресцеин изотиоцианата, показал, что поверхность микрочастиц обогащена гидрофильными фрагментами. Такой состав поверхности микрочастиц позволяет использовать в качестве компонента, чувствительного к ИК лазерному излучению, адсорбированную воду. Оценено влияние состава дисперсионной среды на удельную площадь поверхности микрочастиц и адсорбцию воды. Микрочастицы, стабилизированные сополимером, образуют более тонкий слой для СПЛС, но оба типа микрочастиц пригодны для получения трехмерных структур методом СПЛС в широком диапазоне режимов.

Финансирование исследования: грант Президента Российской Федерации (МК-1974.2019.3) (в части получения и оптимизации микрочастиц), Wallonie-Bruxelles International (WBI) (поддержка мобильности молодых ученых) и гранта РФФИ № 18-32-20184 (в части оптимизации режимов СПЛС).

ДИНАМИКА ИНФИЛЬТРАЦИИ МИОКАРДА IL-10+/STABILIN1+ МАКРОФАГАМИ В ПРОЦЕССЕ ПОСТИФАРКТНОЙ РЕПАРАЦИИ МИОКАРДА

Борис Ким¹, Мария Сергеевна Ребенкова¹, Юлия Викторовна Роговская¹, Александра Энхэевна Гомбожапова^{1,2}, Вячеслав Валерьевич Рябов^{1,2}

¹ НИИ Кардиологии Томского НИМЦ, Томск, Россия;

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

kim_boris@list.ru

Макрофаги (Мф) играют ведущую роль в репарации инфарктированного миокарда и постинфарктном ремоделировании сердца. Известно, что альтернативно активированные Мф (M2) обладают противовоспалительной активностью, регулируют фиброз и ангиогенез. Однако их роль в постинфарктной репарации и ремоделировании миокарда человека остается мало изученной.

Цель: изучить динамику IL-10⁺/Stabilin-1⁺ M2 макрофагальной инфильтрации миокарда у людей, умерших от инфаркта миокарда I типа.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили фрагменты миокарда, взятые во время аутопсии пациентов, умерших от инфаркта миокарда I типа (n=37, средний возраст пациентов — 74±10 лет). В качестве контроля использовали фрагменты миокарда умерших от несовместимой с жизнью травмы, не имеющих сердечно-сосудистой патологии (n=9). Двойное иммунофлюоресцентное окрашивание парафиновых срезов миокарда проводилось с использованием антител к IL-10 и к Stabilin-1. Подсчёт IL-10⁺/Stabilin-1⁺ макрофагов производился при оптическом увеличении ×630 в 20 случайных полях зрения.

Результаты. В зависимости от давности инфаркта было сформировано 4 группы: группа 1 — до 24 часов (n=11), группа 2 — 24–72 часа (n=10), группа 3 — 4–10 суток (n=9), группа 4 — 11–28 суток (n=7). Контролем (группа 5) служили фрагменты миокарда здоровых людей в возрасте 18–40 лет, умерших от несовместимой с жизнью травмы (n=9). В первые трое суток от начала инфаркта миокарда количество IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф в инфарктной и в неинфарктной зонах статистически значимо не отличалось от контрольных значений. На 4–10 сутки количество IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф в инфарктной зоне резко возрастало по сравнению как с контрольными значениями, так и с первыми тремя сутками инфаркта миокарда (p<0,001). В неинфарктной зоне по сравнению с группой контроля количество изучаемых нами Мф также увеличивалось (p=0,003). На 11–28 сутки в инфарктной зоне количество IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф было несколько меньше, чем на 4–10 сутки, однако значительно превышало контрольные показатели (p<0,001). Количество IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф в неинфарктной зоне не отличалось от контрольных значений.

Заключение. Мы продемонстрировали динамику IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф у пациентов, умерших от инфаркта миокарда I типа относительно контрольных значений. Наибольшее количество IL-10⁺/Stabilin-1⁺ Мф в инфарктной и неинфарктной зонах регистрировалось на 4–10 сутки заболевания.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-01268/16).

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ С ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ НА ФУНКЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ, МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}, Александр Петрович Лыков^{1,2}, Мария Александровна Суровцева^{1,2}, Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2}, Евгения Викторовна Янкайте¹

¹ НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

kii5@yandex.ru

Высокая частота встречаемости трофических язв нижних конечностей, склонность к рецидивам, ухудшение качества жизни, инвалидизация и смертность диктуют поиск новых способов лечения. Обнадеживающие результаты лечения получены при использовании

обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы (ПОТ), обусловленные повышенным содержанием ростовых факторов в ней. Однако, влияние плазмы пациентов с трофическими язвами без сахарного диабета и с наличием сахарного диабета (СД) на функциональные свойства клеток, вовлеченных в процесс регенерации трофических язв, исследовано недостаточно.

Цель: изучение влияния обогащенной (ПОТ) и обедненной тромбоцитами (ОТП) плазм пациентов с трофическими язвами различного генеза на пролиферацию и миграцию дермальных фибробластов (ДФ) человека, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) и клеток эндотелиальной линии EA.hy 926 in vitro. ПОТ получали из венозной крови пациентов, центрифугированием в пробирках для плазмолифтинга. ОТП получали осаждением тромбоцитов из ПОТ, затем осадок тромбоцитов в 1 мл плазмы подвергали 2-х кратной заморозке/разморозке, фильтровали. Выделение ДФ из кожи доноров и МСК костного мозга проводили по стандартной методике. В МТТ-тесте показали, что ПОТ и ОТП пациентов с трофическими язвами нижних конечностей без СД значимо стимулирует пролиферацию ДФ, МСК и EA.hy 926 в сравнении с контролем (10% ЭТС) и плазмами пациентов на фоне СД (p<0,05). Плазмы пациентов с трофическими язвами на фоне СД подавляют пролиферацию этих же клеток в сравнении с контролем и пациентами без СД (p<0,05). Исследование пролиферации и миграции ДФ на приборе xCELLigence показало, что ОТП пациентов с трофическими язвами, особенно на фоне СД, значимо снижали пролиферацию ДФ в сравнении с контролем (p<0,05). В тоже время, ПОТ пациентов с трофическими язвами, особенно без СД, значимо стимулирует пролиферацию ДФ в сравнении с контролем (p<0,05). В отношении миграции ДФ показано, что ПОТ, как на фоне СД, так и без, значимо увеличивает миграционный потенциал клеток в сравнении с контролем (p<0,05). Более того, ОТП пациентов с СД значимо стимулирует миграцию ДФ в сравнении с контролем (p<0,05). Таким образом, плазма пациентов с трофическими язвами на фоне сахарного диабета проявляет ингибирующее влияние на функциональную активность ДФ, МСК костного мозга человека и клетки эндотелиальной линии EA.hy 926, а плазма пациентов с трофическими язвами без сахарного диабета стимулирует функциональную активность этих клеток.

СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ ПОЧКИ ПОСЛЕ ЕЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Владимир Игоревич Кирпатовский¹, Сергей Алексеевич Голованов¹, Вера Васильевна Дрожжева¹, Геннадий Дмитриевич Ефремов¹, Эдуард Зиновьевич Рабинович², Михаил Александрович Соколов²

¹ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, Москва, Россия;

² АО «Фарм-Синтез», Москва, Россия

vladkirp@yandex.ru

В опытах на 46 крысах-самцах моделировали острую почечную недостаточность путем односторонней нефрэктомии и ишемии оставшейся почки длительностью 60 или 90 мин. В 1 и 2 сериях (контрольных)

с длительностью ишемии почки 60 и 90 мин. соответственно терапевтических мероприятий не проводили. В 3 и 4 сериях с соответствующей длительностью ишемии почки животным вводили белково-пептидный комплекс (БПК), выделенный методом хроматографии (мол. масса 10–250 кДа) из головного мозга эмбрионов свиньи, ежедневно в течение 10 дней в дозе 0,1 мг/кг. При определении через 2 недели массы единственной почки выявили более выраженную гипертрофию органа в опытных сериях. Определение динамики диуреза и биохимических параметров крови в опытах с 60-минутной ишемией не выявили достоверных различий между опытной и контрольной группами. Однако, при анализе динамики восстановления клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции натрия и кальция через 7 и 14 суток наблюдения при терапии БПК отмечали нормализацию этих показателей, тогда как в контроле они оставались достоверно ниже нормы. В опытах с 90-минутной ишемией при терапии БПК отмечали менее выраженную полиурию и более низкие значения креатинина и мочевины крови через 3 и 7 суток после ишемии по сравнению с контролем. Значения клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции электролитов при терапии БПК на 3 и 7 сутки были достоверно выше, чем в контроле, а значения реабсорбции натрия вообще сохранялись в пределах нормы. При гистологическом исследовании в опытных группах выявили значительное количество гипертрофированных клубочков, тогда как в контрольных опытах они обнаруживались существенно реже, при этом встречались клубочки с признаками гломерулосклероза. Эпителий большинства канальцев в контрольных опытах был в состоянии выраженной гидрорической дистрофии со слущивание многих клеток в просвет канальцев. В обеих опытных группах эпителий большинства канальцев был мало изменен. Через 2 недели в контрольных опытах выявляли очаги склерозирования интерстиция, тогда как при терапии БПК этого не происходило. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном протективном действии БПК при острой постишемической почечной недостаточности даже при значительном повреждении почки.

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ К ЦИСПЛАТИНУ ОПУХОЛЕВЫХ, ИММУННЫХ И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КО-КУЛЬТУРЕ

Кристина Китаева, Дарья Чулпанова, Тихон Прудников, Севиндж Клетухина, Альберт Ризванов, Валерия Соловьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

olleth@mail.ru

Одной из актуальных проблем доклинического скрининга является создание тест-систем для высокопроизводительного скрининга противоопухолевых препаратов. В настоящем исследовании смоделированы две разновидности ко-культуры, содержащие два типа клеток (опухолевые и стромальные клетки) и ко-культуру, содержащую три типа клеток (опухолевые, стромальные и иммунные клетки), изучили межклеточное взаимодействие, а также устойчивость ко-культур к противоопухолевому препарату.

Материалы и методы. Для создания ко-культуры предварительно окрашенные витальными красителями Vybrant Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher Scientific

Inc., США) клетки нейробластомы SH-SY5Y и полученные из костного мозга мезенхимальные стволовые клетки (KM-MCK) смешивали в соотношении 1:1 в двойной совместной культуре, в тройной совместной культуре SH-SY5Y, KM-MCK и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) смешивали в соотношении 1:1:1. Флуоресцентную микроскопию проводили на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе FACS Aria III (BD Biosciences, США). Уровень экспрессии mPNC Bcl-2, Cav1 α , Cav1 β , Rac1 определяли методом количественной ПЦР, приняв 18S rPNC в качестве эталонного гена. Уровень секреции цитокинов/хемокинов клеток анализировали с помощью панели Bio-Plex Pro™ Human Chemokine 40-plex Panel (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение. При помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии показано, что клетки в ко-культурах активно взаимодействуют друг с другом, формируя межклеточные контакты и активно обмениваясь мембранными компонентами в процессе самоорганизации. МТТ-анализ показал ингибирующее влияние цисплатина (10 мкг/мл) на пролиферацию SH-SY5Y в монокультуре и меньшее ингибирующее влияние на пролиферативную активность клеток в ко-культурах. Данные ПЦР показали, что уровень экспрессии Bcl-2, Cav1 α , Cav1 β , Rac1 в SH-SY5Y значительно изменялся в тройных и двойных культурах, включая экспериментальные группы после обработки цисплатином. Анализ цитокинового профиля показал значительные изменения концентрации цитокинов IL-6, IL-8, MCP-1, ENA-78, Gro-a, через 24, 48 и 72 часа культивирования. В целом, представленные результаты подтверждают тезис о влиянии стромальных и иммунных клеток на злокачественные процессы, такие как поддержка роста опухоли, развитие лекарственной устойчивости и повышение метастатического потенциала в опухоли.

Работа выполнена при поддержке Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

ФОРМАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ ПРОЕКТИРОВАНИЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Илья Дмитриевич Клабуков

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

ilya.klabukov@gmail.com

Проблема обобщенного описания динамики живых систем на уровне отдельных клеток, тканей и целых организмов является одной из нерешенных проблем современной биофизики. Используемые сегодня подходы по созданию тканеинженерных конструкций основаны преимущественно на эмпирической комбинации различных типов клеток, материалов и биомолекул. При этом существующие на сегодняшний день модели не позволяют использовать расчеты и количественное прогнозирование параметров биоинженерных органов при имплантации реципиенту.

Целью работы являлся сбор и обобщение существующих элементов формальных подходов к функциональному проектированию витализированных тканеинженерных конструкций.

Методы. На основе систематического анализа литературы были собраны методы, модели и гипотезы

по прогнозированию свойств витализированных имплантатов. Выделены схемы с биологической обратной связью, подходы к описанию динамики тканевой репарации на модели некооперативной игры, действия в многомерных фазовых пространствах, элементы теории групп и симметрий для анализа свойств живых систем, и другие формальные подходы.

Результаты. В рамках проекта <http://biostandard.wikidot.com> были собраны элементы биоконструктора для проектирования тканеинженерных конструкций с прогнозируемыми свойствами. Некоторые найденные подходы нашли свое применение при разработке разделов «Сборника задач по инженерной биологии» [1].

Выводы. Обобщение подходов функционального проектирования позволяет продолжить работу по количественному анализу и моделированию динамических параметров имплантируемых биоинженерных устройств.

Литература:

1. Клабуков И.Д. Сборник задач по инженерной биологии. 2019. Available at SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.2898429>.

ПОЛУЧЕНИЕ УЛУЧШЕННОГО ВАРИАНТА ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ X-СЦЕПЛЕННОЙ АДРЕНОЛЕЙКОДИСТРОФИИ

Наталья Владимировна Клементьева¹, Владимир Сергеевич Попов², Артур Александрович Исаев³, Сергей Львович Киселев^{1,4}

¹ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия;

⁴ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

nvklementieva@gmail.com

X-сцепленная адренолейкодистрофия — это неизлечимое моногенное заболевание, при котором поражается нервная система, а также наблюдается надпочечниковая недостаточность. Эффективным лекарственным препаратом может стать вектор, способный обеспечить экспрессию функциональной копии поврежденного гена. Для доставки терапевтических генов в организм человека все шире используются векторы на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ). Однако их применение часто ограничено низким уровнем тропности вируса к тканям-мишеням.

Наша цель — получить новый вариант ААВ с повышенной тропностью к целевым тканям (головной и спинной мозг, надпочечники) с помощью направленной эволюции вируса *in vivo*. Такой подход включает в себя получение библиотеки мутантных генов капсида ААВ (*Cap*), т.к. именно белки капсида отвечают за тропность, с последующей *in vivo* селекцией через системную доставку библиотеки вирусных частиц взрослым мышам.

Результаты. Создана библиотека случайных мутантов на основе капсида ААВ серотипа 9 (ААВ9). Методом ПЦР с ошибками проведен случайный мутагенез гена *Cap9*, продукт амплификации клонирован в rSub2 вектор, содержащий *cis*-элементы, необходимые для репликации, упаковки и интеграции вируса. Параллельно отработан протокол наработки вирусных частиц и изучено биораспределение ААВ9 при системном введении мышам линии C57BL/6. Для этой задачи мы использовали

ААВ вектор, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Сборку вирусных частиц проводили с использованием *trans*-плазмиды, содержащей ген *Cap9*, и аденовирусной желперной плазмиды. Через 16 дней после введения вируса был проведен забор органов и выделена геномная ДНК. Эффективность вирусной трансдукции различных тканей оценивали по уровню экспрессии в них репортерного гена GFP. В результате ПЦР-анализа было показано, что серотип 9 обладает высокой тропностью к мышцам, сердцу, печени и легким, что согласуется с данными литературы. Кроме того, мы обнаружили достаточно высокую экспрессию GFP в надпочечниках. Однако, эффективной трансдукции клеток головного и спинного мозга не наблюдалось, несмотря на то, что ААВ9 способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и рекомендован для генной терапии ЦНС.

Полученные нами данные подтверждают необходимость поиска улучшенного варианта вирусного капсида, на основе которого в дальнейшем может быть разработан геннотерапевтический препарат для лечения X-сцепленной адренолейкодистрофии.

Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента РФ СП-1 198.2019.4.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕЦЕПТОРА УРОКИНАЗЫ UPAR С РЕЦЕПТОРОМ ХЕМОКИНОВ FPRL РЕГУЛИРУЕТ НАПРАВЛЕНИЕ РОСТА АКСОНОВ

Полина Сергеевна Климович^{1,2}, Екатерина Владимировна Семина^{1,2}

¹ Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

lex2050@mail.ru

Деградация внеклеточного матрикса (ВКМ) играет важную роль в регенерации органов и тканей, облегчая миграцию клеток и стимулируя ангиогенез и нейрогенез. Урокиназа (uPA) и урокиназный рецептор (uPAR), активируя внеклеточный протеолиз, высвобождают факторы роста и хемокины, задепонированные в ВКМ, и стимулируют миграцию клеток и рост сосудов по градиенту их концентрации. Обладая высокой подвижностью на мембране, GPI-заякоренный uPAR может латерально взаимодействовать со многими рецепторами, модулируя их функцию в зависимости от состава сигнальных комплексов. uPA при связывании с uPAR осуществляет протеолиз uPAR с появлением растворимых форм рецептора suPAR. suPAR обладает свойствами хемокина: хемотактический эффект опосредован формилпептидными рецепторами FPRL1 и FPRL2 на базофилах, FPRL1 — на моноцитах и FPR — на CD34+ гематопозитических стволовых клетках. Ранее нами обнаружены навигационные свойства uPAR в регуляции направленного роста аксонов: блокирование активности uPAR нарушало траекторию роста аксонов и увеличивало их ветвление. Мы предположили, что uPAR может регулировать траекторию роста аксонов за счет взаимодействия с хемокиновым рецептором FPRL1, который экспрессируется на аксонах.

В исследовании с использованием эксплантной культуры спинального ганглия мышцы (СГ) нами обнаружено, что повышенное содержание uPAR на мембране аксонов стимулирует рост нейритов даже в отсутствие урокиназы (СГ мышей, нокаутных по гену uPA, uPA-/-).

Кроме того, введение растворимой формы suPAR мышам uPA-/- более, чем в три раза ($p < 0,05$), стимулировало рост нейритов по градиенту концентрации по сравнению с контролем (альбумин).

Изучая механизмы навигационных свойств uPAR, мы обнаружили, что в первичной культуре нейронов, выделенных из СГ, uPAR солюбилизуется с FPRL1 не только в телах нейронов, но и на конусах растущих аксонов. Для подтверждения взаимодействия FPRL1 с suPAR мы провели ингибиторный анализ с использованием пертусситоксина, блокирующего внутриклеточную сигнализацию FPRL1. Чтобы исключить эффекты эндогенного uPAR использовали СГ мышей, нокаутных по гену uPAR (uPA-/-). Оказалось, что блокирование FPRL1 в 2 раза снижает рост нейритов СГ мышей uPA-/-, вызванный действием suPAR ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (альбумин).

Таким образом, нами впервые показано, что suPAR обладает хемотактическими свойствами и опосредует направленный рост аксонов по механизму взаимодействия с хемокиновым рецептором FPRL1 на мембране конуса роста аксона.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 17-04-00386).

ИН ВИВО БИОРЕАКТОР ДЛЯ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ

Алексей Вячеславович Ковалев

ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

kovalov1@mail.ru

Биореактор — это важнейшая составляющая классической триады технологии тканевой инженерии (клетки, скаффолд, биореактор). Ин виво биореакторы (так называемые регенераторы), интегрированные с живым организмом, представляют собой новейшее поколение данных устройств, пока еще редко применяющееся в клинической практике.

Целью настоящего исследования являлись разработка, фабрикация и тестирование нового типа биореактора-регенератора, интегрируемого с лабораторными млекопитающими для построения тканеинженерных конструкций непосредственно на раневой поверхности.

Для создания контролируемого водного окружения вокруг поврежденных участков тела использовались специальные сконструированные камеры-изоляторы, герметично соединенные с поверхностью кожи и удерживающие растворы на ране. Биореактор, интегрированный с телом животных-моделей с функцией пневмоакустического распыления бессывороточной среды, включает помимо камеры-изолятора специальный распылитель с приводящей гибкой трубой для подачи жидкости. На раневой поверхности располагаются тканеинженерные конструкции, через форсунки в стенке емкости внутрь подается воздушно-водная смесь в виде облака аэрозоля и поддерживается постоянная температура этой смеси, что обеспечивает адекватное клеточное дыхание и питание при взаимодействии живого организма и тканеинженерных конструкций. Газовый состав легко регулируется; более того, могут быть добавлены газовые трансмиттеры.

Усовершенствование конструкций камер-изоляторов медицинского назначения позволило заменить солевые изотонические растворы на культуральные среды, а также разработать и внедрить в клиническую практику

новые способы консервативного лечения посттравматических частичных дефектов ногтевых фаланг не только у детей, но и у взрослых пациентов. Регенерирующие кончики пальцев, несмотря на признаки атипичного строения, успешно закрывали дефект.

Биореактор позволяет эффективно наращивать клеточную массу внутри тканеинженерных конструкций, находящихся на раневой поверхности, на начальных этапах приживления. Толщина скаффолдов может быть увеличена — при таких условиях по всей толщине расположены живые клетки с высокой синтетической активностью.

Результаты наших исследований показывают, что создан, протестирован и уже показал свою функциональность новый биореактор, интегрируемый с телом животных-моделей. Это является важным шагом на пути усовершенствования технологий биореакторов для тканевой инженерии.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ VEGF В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VITRO МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Ирина Викторовна Кожухарова¹, Наталья Михайловна Минкевич², Лариса Леонидовна Алексеенко¹, Ирина Сергеевна Смирнова¹, Валерий Всеволодович Зенин¹, Николай Николаевич Никольский¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;*

² *Биологический факультет, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия*

kojuxarova@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) выделены из различных тканей организма и находят широкое применение в клинической практике. В настоящее время накапливаются доказательства того, что терапевтический эффект МСК обеспечивается за счет их способности взаимодействовать с другими клетками посредством секреции паракринных факторов. Одним из важнейших факторов, обладающим ангиогенным, трофическим и антиапоптотическим действием, является эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF). Показано, что МСК, секретирующие VEGF, оказывают терапевтический эффект.

Целью работы было сравнить базальный и индуцированный уровень экспрессии VEGF в МСК и выяснить возможные механизмы изменения уровня секреции VEGF при культивировании in vitro.

Использовали МСК, выделенные из менструальной крови 3-х здоровых доноров. Показано, что МСК от разных доноров различаются по базальному уровню секреции VEGF. При монослойном 2D культивировании секреция VEGF быстро снижается. Культивирование МСК даже на поздних пассажах в виде сфероидов значительно увеличивало секрецию VEGF. Повышенный уровень секреции сопровождался усилением экспрессии мРНК VEGF и транскрипционного фактора HIF-1 в сфероидах.

Проверяли действие экзогенных ростовых факторов TGF β , VEGF и факторов сыворотки крови на секрецию VEGF и жизнеспособность МСК. Показали, что TGF β (0,1 нг/мл) увеличивал секрецию и жизнеспособность 2D культур, что сопровождалось увеличением количества α -sma позитивных МСК. Экзогенный VEGF (10 нг/мл) увеличивал жизнеспособность 3D культур МСК, что сопровождалось появлением CD309 (рецептор VEGFR2) позитивных клеток. Снижение концентрации

сыворотки до 1% в течение 7 дней не влияло на уровень секреции VEGF в МСК, но снижало жизнеспособность клеток в сфероидах. Противоопухолевый препарат доксорубин незначительно повышал секрецию VEGF в 2D культурах МСК и не влиял на секрецию в сфероидах. Рекомбинантный VEGF улучшал жизнеспособность МСК, обработанных доксорубином.

МСК, культивируемые в сфероидах могут быть предпочтительней, чем монослойные для терапевтического ангиогенеза, так как под действием эндогенных факторов секреция VEGF в них выше и стабильнее. Однако у пациентов с опухолевыми заболеваниями индукция VEGF может играть негативную роль, вызывая неоваскуляризацию опухолей.

Работа была поддержана Российским научным фондом (проект 19-14-00108).

ВЛИЯНИЕ МЕТАБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Екатерина Петровна Колеватых

ФГБОУ ВО Кировский государственный медицинский университет, Киров, Россия

hibica@mail.ru

Несмотря на широкое применение пробиотиков — препаратов, изготовленных из живых представителей нормальной микрофлоры организма человека, неуклонно возрастает заболеваемость населения, связанная с дисбалансом состояния микробиоты. Цель исследования заключалась в установлении влияния иммунобиологических метабиотических препаратов бактериального происхождения на микробиологические, иммунологические, биохимические показатели при регенеративных процессах экспериментальных животных. Разработаны методики получения метабиотического препарата из пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* и изучены биологические свойства метаболитов. Проведен сравнительный анализ микробного статуса кишечника, полости рта экспериментальных животных при применении пробиотических и метабиотических иммунобиологических препаратов при регенеративных процессах. Изучена динамика изменения содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, сывороточных иммуноглобулинов класса А, М, G, Е, секреторного IgA, фагоцитарной активности нейтрофилов макроорганизма при употреблении пробиотических и метабиотических препаратов. Объектом исследования служили штаммы *Lactobacillus acidophilus*, из которых был получен препарат на основе продуктов метаболизма лактобактерий. Под наблюдением находились 200 лабораторных животных — белых беспородных мышей с дефектами кожи и подкожно-жирового слоя. Установлено, что при местном воздействии метаболитов бактерий, а также одновременном пероральном введении биологически активных веществ пробиотиков, увеличивается количество противовоспалительных цитокинов, повышается уровень секреторного иммуноглобулина класса А, бактерицидная и фунгицидная активность.

Таким образом, научно обоснована и экспериментально доказана необходимость наиболее эффективного и безопасного восстановления собственной (индигенной) микробиоты макроорганизма путём использования пребиотиков и метабиотиков, а также их композиций — метапребиотиков согласно предварительного определения уровня продуктов обмена аутофлоры каждого индивидуума.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗНАЧИМОСТИ МАРКЕРА CD133 В ПРОЛИФЕРАТИВНОМ ПОТЕНЦИАЛЕ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ И ПОИСК ПУТЕЙ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ ЭТИХ КЛЕТОК

В.А. Колесникова^{1,2}, Н.С. Самойленкова³, Е.А. Савченко³, С.Р. Дрозд³, А.В. Ревущин¹, Г.В. Павлова^{1,4,5}

¹ ФГБУН «Институт Биологии Гена РАН», Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ООО «Апто-фарм», Москва, Россия;

⁴ ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия;

⁵ Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

Barbara-1402@yandex.ru

Глиобластома — злокачественная первичная опухоль головного мозга, которая является неизлечимой на данный момент времени и поэтому требует особенного внимания со стороны исследователей. Перспективным направлением является применение клеточных и молекулярно-генетических методов.

Целью работы является изучение роли поверхностного маркера CD133 клеток глиобластомы человека в их пролиферативном потенциале и исследование возможности управления пролиферацией и дифференцировкой этих клеток.

Материалы и методы. В эксперименте использовались частично перевиваемые культуры, полученные из клеток глиобластомы человека (5 образцов) по разработанной в лаборатории методике. Для RT-PCR использовались панель, состоящую из онкомаркеров (CDK4, CDK6, EGFR, FGFR, FSHR, MAP2, MDM2, MELK, Olig2, PDGF, PDGFR) и маркеров стволовости (bIII-tubulin, Nestin, Nanog, Notch2, Oct4, SOX2). Клетки в культурах проходили 5 пассажей, после чего они криоконсервировались.

С целью остановки разрастания опухоли на клеточные культуры глиобластомы человека одновременно воздействовали блокаторами пролиферации (смесь аптамеров VEGF, as1411 и r-21) и индукторами нейтральной дифференцировки (ретиноевая кислота (RA), интерлейкин 6 (IL6), GDNF). Культуры исследовали на 10 (RT-PCR, МТТ-тест) и 20 день (МТТ-тест) после воздействия дифференцировочного фактора.

Результаты. При проведении анализа экспрессии маркера CD133, характерного и нормальным, и опухолевым стволовым клеткам, обнаружено, что в образце Г2 экспрессия CD133 была повышена. При использовании смеси аптамеров и IL6 наблюдалось значительное снижение пролиферации до 25%, при этом увеличивалась экспрессия PDGFRa. Все три комбинации снижают экспрессию CDK6, EGFR и повышают экспрессию CDK4, PDGFB. Комбинации RA с IL6 снижают экспрессию FSHR. При использовании всех комбинаций увеличивалась экспрессия GFAP и bIII-tubulin, снижалась экспрессия Oct4, что говорит о вероятности сдвига состояния клеток в сторону нейтральной дифференцировки. При использовании аптамеров с IL6 снижалась экспрессия CD133, что не наблюдалось в других случаях.

Выводы. Полученные данные говорят о возможности управления пролиферативным и дифференциальным потенциалом опухолевых клеток глиобластомы. Можно утверждать, опираясь на этот эксперимент, что

комбинация антипролиферативных аптамеров и IL6 может быть эффективна для снижения пролиферации опухлевых клеток глиобластомы человека.

Планируется проведение экспериментов с CD133⁺ и CD133⁻ культурами клеток глиобластомы человека.

ДИНАМИКА ЯДЕРНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FOXP3 В CD4⁺ ЛИМФОЦИТАХ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Ирина Вячеславовна Кологривова^{1,2}, Татьяна Евгеньевна Суслова¹, Вячеслав Валерьевич Рябов^{1,2}, Марина Александровна Штатолкина¹, Оксана Александровна Трубачева¹

¹ НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия;

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

ikologrivova@gmail.com

Воспаление является неотъемлемым компонентом ремоделирования и регенерации ткани сердца после инфаркта миокарда (ИМ). Моноциты играют важную роль при постинфарктном ремоделировании. Известно, что их функция контролируется FoxP3⁺ T-регуляторными лимфоцитами. При этом экспрессия фактора FoxP3 показана и в нерегуляторных CD4⁺ клетках, в которых он снижает TCR-опосредованный сигналинг.

Целью исследования стало изучение экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 в CD4⁺-лимфоцитах во взаимосвязи с субпопуляционным составом моноцитов после острого первичного переднего инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST.

Мононуклеарные лейкоциты периферической крови пациента были выделены на 1, 3, 7 и 30 сутки после острого первичного переднего инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST. Во фракции мононуклеаров оценивали содержание CD14⁺⁺CD16^{lo}, CD14⁺⁺CD16^{hi}, CD14⁺CD16^{hi} моноцитов, CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{lo}FoxP3⁺ лимфоцитов и ядерную локализацию фактора FoxP3 методом проточной цитометрии с визуализацией.

Мы наблюдали увеличение содержания CD14⁺⁺CD16^{hi} моноцитов с 9,97% (1 сутки) до 27,6% (7 сутки) и CD14⁺CD16^{hi} моноцитов с 4,71% (1 сутки) до 11,1% (7 сутки) от общего содержания моноцитов; содержание CD14⁺⁺CD16^{lo} моноцитов снижалось с 85% (1 сутки) до 61% (7 сутки). Через месяц мы выявили 82,2% CD14⁺⁺CD16^{lo}, 8,57% CD14⁺⁺CD16^{hi} и 8,97% CD14⁺CD16^{hi} моноцитов. Содержание CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ лимфоцитов изменялось незначительно: 6,83% (1 сутки); 6,69% (3 сутки); 6,44% (7 сутки); 5,51% (30 сутки) от всех CD4⁺ лимфоцитов, и сопровождалось увеличением уровня транслокации FoxP3 в ядро (с 83,5% (1 сутки) до 88,4% (30 сутки)). В то же время, мы выявили волнообразную динамику содержания CD4⁺CD25^{lo}FoxP3⁺ лимфоцитов (2,81% (1 сутки); 2,50% (3 сутки); 3,06% (7 сутки); 2,13% (30 сутки), что сопровождалось резким снижением уровня транслокации FoxP3 в ядро в этих клетках (с 57,4% (1 сутки) до 35,7% (7 сутки)).

Выявленное изменение содержания FoxP3⁺CD4⁺ лимфоцитов (особенно мало изученной на сегодняшний день субпопуляции CD4⁺CD25^{lo}FoxP3⁺) после острого

ИМ свидетельствует об их вовлеченности в регуляцию воспаления, сопровождающего процессы регенерации ткани сердца. Однонаправленная динамика ядерной транслокации FoxP3 и субпопуляций моноцитов позволяет предположить, что FoxP3⁺ T-лимфоциты вносят вклад в модуляцию моноцитарной функциональной активности. Дальнейшие исследования могут способствовать разработке новых подходов управления процессами ремоделирования ткани сердца после ИМ.

C2C12 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА ПРИ ЛАМИНОПАТИЯХ

Маргарита Юрьевна Комарова^{1,2}, Оксана Алексеевна Иванова^{1,3}, Елена Владимировна Игнатьева¹, Рената Игоревна Дмитриева¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

³ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

komarovamy96@yandex.ru

Введение. Механизм дегенерации мышечной ткани остается актуальной темой для исследователей. Активация этого процесса происходит во многих заболеваниях, например, при ламинопатиях. Эти заболевания характеризуются широким спектром нервно-мышечных, сердечных и метаболических нарушений. В нашем исследовании мы сосредоточились на мутациях, вызывающих аутосомно-доминантную мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса (G232R) и семейную частичную липодистрофию (R482L). Целью нашей работы является создание модели ламинопатий на основе клеточной линии C2C12 и изучение механизмов дегенерации мышечной ткани.

Методы. С помощью сайт-специфического мутагена были сделаны плазмиды, несущие кДНК ламина А человека с мутациями, приводящими к мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса (G232R) и липодистрофии (R482L). Далее была проведена трансформация мутантными плазмидами E. coli для наработки плазмидной ДНК. Полученную плазмидную ДНК проверяли секвенированием по Сенгеру. Далее плазмиды использовались для сборки лентивируса, содержащего мутантные варианты кДНК ламина. После этого вирусом заражали клеточную линию миобластов мыши C2C12. Эффективность заражения оценивали иммуноцитохимическим окрашиванием антителами к ламину человека. Уровень мРНК генов интереса оценивался методом qPCR, а уровень белка — Вестер-блоттинг.

Результаты. В клетках C2C12, несущих мутации, мы не увидели смену типа мышечных волокон с медленных (MYH7) на быстрые (MYH1) после индукции миогенной дифференцировки. В то же время, мы наблюдали повышение уровня мРНК транскрипционного фактора MYOG, регулирующего миогенез, и эмбрионального миозина MYH3 при мутации R482L по сравнению с диким типом. В то же время уровень мРНК и белка быстрых и медленных миозинов рос в течение мышечной дифференцировки по сравнению с диким типом. Возможно, это указывает на развитие мышечных волокон в ответ на нарушения, вызванные мутациями. Также выявленный нами пониженный уровень мРНК гена DES может указывать на вызванные мутациями проблемы в цитоскелете клеток, что приводит к нарушениям в слиянии миобластов. На это указывает и пониженный уровень мРНК гена

МУМК, ответственного за слияние клеточных мембран. Возможно, в ответ на это активируется другой ген, ответственный за образование поры — МУМХ. Это недавно открытый микробелок и его функция еще не до конца изучена. Таким образом, наша модель является релевантной для изучения процессов дегенерации мышечного волокна при ламинопатиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10178-П.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ЭПИКАРДА ИЗ НЕОНАТАЛЬНЫХ СЕРДЕЦ МЫШИ

Анастасия Валерьевна Комова^{1,2}, Константин Владимирович Дергилев², Зоя Ивановна Цоколаева², Елизавета Израилевна Ратнер², Елена Викторовна Парфенова²

¹ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

komova1305@yandex.ru

Клетки эпикарда принимают активное участие в эмбриональном развитии сердца и его репарации при повреждении, что делает эпикард потенциальной мишенью для лечения заболеваний, а клетки эпикарда перспективным инструментом клеточной терапии. Способность клеток эпикарда вступать в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) с последующей дифференцироваться в клетки сосудов и фибробласты позволяет рассматривать его в качестве клеточной ниши прогениторных клеток эпикарда. В связи с этим разработана методика получения этого типа клеток и изучение механизмов регуляции их функций является важнейшей задачей регенеративной медицины.

Цель исследования: разработать метод получения и охарактеризовать свойства полученных клеток эпикарда.

Методы. В работе использованы сердца неонатальных мышей линии C57Bl6. Диссоциация клеток эпикарда проводилась с помощью 0,25% раствора трипсина (5 мин.). Культивирование клеток эпикарда проводили с среде IMDM, содержащей глутамин, 1% фетальной сыворотки теленка (embryonic cell grade), 1% пенициллин-стрептомицина, 2-меркаптоэтанол. Пролиферацию клеток оценивали с помощью МТТ теста, иммунофенотип — с помощью иммуноцитохимии.

Результаты. Показано, что кратковременная обработка неонатальных сердец мыши ферментативным раствором трипсина способствует диссоциации мезотелиального слоя клеток, что позволяет получить культуру прогениторных клеток эпикарда (ПКЭ) *in vitro*. ПКЭ имеют «cobblestone» морфологию, сохраняют плотные (ZO1+) контакты и характеризуются экспрессией эпикардальных маркеров (Wt1, POD1, TBX18). При культивировании в условиях низкой плотности они спонтанно вступают в ЭМП, теряют плотные контакты и приобретают веретенообразную форму. При этом часть клеток приобретает маркеры фибробластов (виментин, CD90, FSP1) и гладкомышечных клеток (α -гладкомышечный актин, калпонин). Культивирование в присутствии рекомбинантных факторов роста (SCF или PDGF bb) достоверно увеличивает пролиферативную активность ПКЭ.

Таким образом, кратковременная обработка неонатальных сердец мыши раствором трипсина способствует получению культуры ПКЭ *in vitro*, которая сохраняет

соответствующую морфологию, иммунофенотип, способность вступать в ЭМП и трансформироваться в гладкомышечные клетки и фибробласты. Действие SCF и PDGF bb активирует пролиферативную активность ПКЭ, что может указывать на их роль в качестве активаторов эпикарда в процессе репарации сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-15-00384 и РФФИ 19-29-04164.

ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК ОТ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ И РЕДАКТИРОВАНИЕ МУТАЦИИ F508DEL В ГЕНЕ CFTR С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9

Екатерина Владимировна Кондратьева¹, Яна Сергеевна Слесаренко¹, Эльмира Пайзутдиновна Адильгереева¹, Елена Львовна Амелина², Вячеслав Юрьевич Табаков¹, Арина Артуровна Анучина¹, Кирилл Дмитриевич Устинов¹, Матвей Ильич Ясинский¹, Миляуша Иршатовна Зайнитдинова¹, Екатерина Сергеевна Воронина¹, Александр Вячеславович Лавров^{1,3}, Светлана Анатольевна Смирнихина¹

¹ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия;

² Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Россия;

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

ekaterina.kondratyeva@gmail.com

Муковисцидоз (МВ) — заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, самой частой из них является F508del. В результате мутации нарушается транспорт ионов хлора и натрия через клеточную мембрану, что вызывает у пациента нарушения функционирования желез внешней секреции. На сегодняшний день МВ не имеет этиотропной терапии. В последние годы активно развиваются методы геномного редактирования, позволяющие корректировать мутации. Одним из возможных генно-клеточных подходов к лечению заболеваний является получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от больного, редактирование в клетках мутации, их дифференцировка, например, в клетки респирационного эпителия и последующая трансплантация больному. Целью работы было получить ИПСК из фибробластов больных МВ и редактировать мутацию F508del в гене *CFTR* с помощью CRISPR/Cas9.

Репрограммирование фибробластов от трех пациентов с МВ, гомозиготных по мутации F508del, осуществляли с помощью вируса Сендай с факторами Яманак (CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit). Плюрипотентность доказывали с помощью иммуноцитохимического анализа и количественной ПЦР на маркеры плюрипотентности, а также дифференцировки в клетки трех зародышевых листков. Для редактирования мутации F508del использовали нуклеазы (eSpCas9(1.1), SpCas9(HF4) и SaCas9) в комбинации с различными sgRNA, подобранными на разные участки ДНК рядом с мутацией (sgCFTR##1, 2, 3, sa_sgCFTR#3), для репарации двуцепочечных разрывов разработали четыре одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN-CFTR##1, 2, 3 и ssODN-saCFTR). Поскольку структура геномного сайта предположительно влияет на эффективность редактирования, указанные sgRNA также тестировали на искусственной плазмиде, содержащей locus *CFTR* с мутацией

F508del. Анализ образованных инделов и вставок СТТ (исправление мутации F508del) оценивали с помощью NGS.

В результате работы были получены и полностью охарактеризованы линии ИПСК от трех пациентов с МВ. На одной из линий проведены эксперименты по редактированию мутации F508del в гене *CFTR*. С учетом эффективности трансфекции частота внесения инделов в ген *CFTR* составила от 53 до 64% аллелей для различных комбинаций Cas9 и sgRNA. Наибольшую частоту исправления мутации F508del отмечали при использовании SpCas9(1.1)-sgCFTR#1 с ssODN-CFTR#1 — 3,5% аллелей.

Результаты показывают низкую эффективность исправления мутации, не позволяющую в существующем виде использовать данную технологию для лечения больных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-75-20095.

КОМПЛЕКС САЛИНОМИЦИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ КРЕМНИЯ ЭФФЕКТИВНО ИНГИБИРУЕТ ОПУХОЛЕВОЙ РОСТ IN VITRO И IN VIVO

Михаил Анатольевич Конопляников^{1,4}, Виктор Юрьевич Тимошенко², Юлия Валерьевна Каргина², Гаухар Маратовна Юсубалиева¹, Владимир Анатольевич Кальсин¹, Анатолий Георгиевич Конопляников³, Владимир Павлович Баклаушев¹, Петр Сергеевич Тимашев⁴

¹ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия;

² Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия;

⁴ Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

mkonopl@mail.ru

Цель работы — выявление эффекта салиномицина (Sal), известного селективного ингибитора опухолевых стволовых клеток (ОСК), в виде комплекса с наночастицами кремния (nano-Si), на культивируемые клетки глиобластомы человека *in vitro*, а также на карциному легкого Льюис мышей *in vivo*. Для исследований *in vitro* использовали клетки глиобластомы человека, полученные из образца опухоли пациента ФНКЦ ФМБА России, культивируемые по стандартной методике. Для оценки жизнеспособности клеточной культуры после воздействия салиномицина (40 мкМ) и nano-Si-Sal (40 мкМ), в режиме реального времени в течение 4 суток, использовали клеточный анализатор xCELLigence (ACEA Biosciences Inc). Для исследований *in vivo* использовались лабораторные мыши C57Bl/6, 3-месячные самцы, массой 20–22 г. Мышам на 10 сутки после перевивки опухоли вводили однократно внутривенно препараты из расчета 12,5 мг салиномицина на кг веса животного. Наблюдали за динамикой роста опухоли и гибелью животных в группах. Часть подопытных и контрольных животных подвергали эвтаназии на 21 сутки после перевивки опухоли, извлекали легкие, фиксировали в уксуснокислом спирте и подсчитывали количество опухолевых метастатических узлов в легочной ткани.

В исследованиях *in vitro* было продемонстрировано, что комплекс nano-Si-Sal, как и сам салиномицин, обладал, по сравнению с контрольной группой, выраженным

цитотоксическим действием на клетки глиобластомы человека. Аналогично, в исследованиях *in vivo* было показано, что в комплексе с nano-Si салиномицин замедлял скорость увеличения опухоли, по сравнению с контрольной группой, причем в еще большей степени, чем сам салиномицин, и при этом уменьшал количество метастатических узлов в легких. Контрольные животные погибали значительно раньше животных в экспериментальных группах. В целом, наши результаты показывают, что салиномицин в виде комплекса с nano-Si, оказывает выраженный противоопухолевый эффект, как на клетки глиобластомы человека *in vitro*, так и на карциному легкого Льюис *in vivo*, предположительно за счет ингибирования ОСК и снижения метастатических поражений.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki67 И РЕЦЕПТОРОВ К ЭСТРОГЕНУ ПРИ РЕГИОНАРНОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Константин Вячеславович Конышев^{1,2}, Сергей Владимирович Сазонов^{1,2}

¹ Патолого-анатомическое отделение, ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия;

² Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

kon-konyshev@yandex.ru

Исследование такого проявления гетерогенности опухолей, как различия иммунофенотипа первичной и метастатической опухолей при раке молочной железы, способствует расширению представлений о биологических закономерностях канцерогенеза. Взаимосвязи изменений ключевых биомаркеров, в том числе маркера пролиферации Ki67, остаются неизученными.

Цель: изучение связи между уровнем Ki67 в ткани первичной опухоли и изменениями экспрессии этого маркера и рецепторов к эстрогену (ER) при регионарном метастазировании рака молочной железы (РМЖ).

Методы. На материале первичной опухоли и регионарных метастазов 83 больных РМЖ без неоадьювантной терапии выполнялось ИГХ-исследование экспрессии рецепторов к эстрогену и Ki67 (клоны 1D5 и MIB-1, Dako, Дания) с использованием автостейнера Dako. Экспрессия ER оценивалась по Allred (0 и 2 балла — отрицательный статус, 3–8 баллов — положительный статус опухоли), Ki67 — как процент окрашенных опухолевых клеток среди не менее 500 клеток в полях зрения с наибольшей пролиферативной активностью (<20% — опухоль с низкой пролиферативной активностью, ≥20% — опухоль с высокой пролиферативной активностью). Определяли изменение статуса ER и Ki67 и изменение уровня экспрессии ER и Ki67 при метастазировании. Строили следующую регрессионную модель (метод наименьших квадратов, ПО Gretl): зависимая переменная — уровень Ki67 в первичной опухоли, предикторы: ER-статус первичной опухоли, сдвиги экспрессии (ER — на 1 балл и более, Ki67 — на 5% и более) и изменения статуса (ER — с положительного на отрицательный и с отрицательного на положительный, Ki67 — с высокого на низкий и с низкого на высокий) биомаркеров при метастазировании. Степень согласия модели оценивали по значению скорректированного R².

Результаты. Сдвиг уровня экспрессии ER и изменение статуса Ki67 при метастазировании были признаны незначимыми ($p > 0,05$). Значимая связь с уровнем Ki67 в клетках первичной опухоли была обнаружена для ER-статуса первичной опухоли (регрессионный коэффициент — 24,8, $p < 0,001$), изменения статуса ER при метастазировании ($-13,2$, $p = 0,02$) и сдвигом уровня экспрессии Ki67 при метастазировании (12,7, $p = 0,002$). Скорректированный R^2 для данной модели составил 0,42.

Заключение. Высокий уровень экспрессии маркера пролиферации Ki67 в клетках первичной опухоли коррелирует с отрицательным ER-статусом первичной опухоли, а также снижением вероятности изменения ER-статуса и повышением вероятности изменения уровня экспрессии Ki67 при регионарном метастазировании рака молочной железы.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И СУДЬБА МАСШТАБНЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕХНОЛОГИЕЙ CRISPR/CAS9 У МЫШЕЙ: ОТ ЗИГОТ ДО СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Алексей Николаевич Кораблев¹, Инна Евгеньевна Пристяжнюк¹, Юлия Михайловна Минина¹, Ирина Александровна Серова¹, Вениамин Семенович Фишман^{1,2}, Мария Михайловна Гридина¹, Timofey Rozhdestvensky³, Leonid Gubar³, Boris Skryabin³, Олег Леонидович Серов^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Medical Faculty, Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models (TRAM), University of Münster, Münster, Germany

korablevalexeyn@gmail.com

В настоящее время, технология CRISPR/Cas9 широко применяется для адресного редактирования геномов животных как уровне единичных нуклеотидов, так и масштабных хромосомных перестроек. Недавно, с помощью микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 в зиготы мышей, нами были получены животные, несущие целевые хромосомные перестройки в хромосоме 6: делеции и инверсии (размером 1137 т.п.о.) и дупликации (размером 2374 т.п.о.), затрагивающие единственный ген *Cntn6* (кодирует контактин-6). Данное сообщение направлено на выяснение времени возникновения этих перестроек и их судьбы в ходе развития носителей. В нашем распоряжении было 2 фаундера (основателя), несущих одновременно дупликацию и делецию, и 5 основателей, несущих только делецию. Установлено, что наследование делеции у F1 от скрещивания пяти основателей с мышами C57BL/6 близко к ожидаемому соотношению 1:1, что указывает на отсутствие мозаицизма среди гамет. По данным FISH- и Саузерн-анализов, делетированный фрагмент ДНК не был выявлен на других хромосомах. Анализ последовательностей в местах, вновь образованных «стыков ДНК» у 7-ми носителей делеции, показал, что у 3-х основателей не выявлено каких-либо изменений, у 3-х других замены были в пределах от 1 до 10 нуклеотидов и одного 101 п.о. Важно, что один основатель имел «идеальную» делецию в обоих гомологах. Таким образом, эти данные позволяют сделать вывод, что целевые делеции происходили чаще в одном

из пронуклеусов и с достаточно высокой точностью. Оба основателя-носители одновременно делеции и дупликации были мозаики: около четверти клеток были гетерозиготными по делеции, другая четверть гетерозиготными по дупликации и около 50% клеток с нормальным генотипом. Кроме того, и делеции и дупликации передавались потомкам F1 в соотношении близком к ожидаемому. По данным полногеномного секвенирования обе дуплицированные копии сохранили свою целостность и содержали минимальные изменения на границах «стыков». Анализируя полученные данные, мы предполагаем, что у этих основателей-носителей делеции и дупликации произошли путем межхроматидного обмена в одном из пронуклеусов на стадии зиготы и, как результат, хроматиды с делецией и дупликацией расходятся в разные бластомеры. В целом, применение технологии CRISPR/Cas9 позволяет получать масштабные направленные хромосомные перестройки с минимальными нецелевыми воздействиями в целевом геноме.

Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта РАН № 0324-2019-0041.

ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ КАРБОКСИАЛКИЛХИТОЗАНОВ ЛИБО ПОЛИАЛКИЛЕНКАРБОНАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO

Анастасия Викторовна Корель¹, Александр Геннадьевич Самохин¹, Василий Алексеевич Кузнецов², Екатерина Олеговна Землякова², Вадим Олегович Ткаченко³, Александр Викторович Пестов²

¹ Лабораторно-экспериментальный отдел, ФГБУ «НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна», Новосибирск, Россия;

² Лаборатория органических материалов, ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Пастовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

³ ФГБУН Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия

niokr9@gmail.com

На современном этапе внедрение тканеинженерных разработок для нужд регенеративной медицины идет параллельно с разработкой различных носителей для доставки биологических агентов и клеток. Одними из вариантов таких носителей могут стать материалы на основе карбоксиалкилхитозанов либо полиалкиленкарбонатов, каждая из которых имеют свои преимущества для решения различных прикладных задач — первые имеют хорошую биосовместимость, а также определенный антибактериальный эффект, вторые способны к равномерной объемной деградации и при этом не закисляют pH среды.

В условиях in vitro нами была выполнена оценка биосовместимости гидрогелей на основе карбоксиалкилхитозанов и политриметиленкарбоната линейного строения (пТМК) по отношению к культуре клеток фибробластов человека (Phoenix-модифицированные HEK 293) со сроком наблюдения 12 суток. Методы исследования биосовместимости: светооптическая микроскопия для изучения морфологии клеточной культуры, а также выполнение оценки цитотоксического влияния испытываемых материалов при помощи МТТ-теста. Все образцы гелей были стерилизованы методом лучевой стерилизации.

Наилучшим образом в эксперименте продемонстрировали себя гидрогели карбоксиэтилхитозана (КЭХ), сшитого глутаровым альдегидом, и интерполиэлектролитные гидрогели карбоксиметилхитозана, КЭХ и карбоксиметилцеллюлозы с альгинатом натрия, сшитые хлоридом кальция — клетки фибробластов в присутствии таких материалов, а также при непосредственном контакте с ними, проявляли хорошую адгезию к поверхности культурального планшета и росли с образованием конфлюэнтного клеточного монослоя. Величины индекса цитотоксичности при этом указывали на отсутствие негативных эффектов исследуемых материалов на клетки. Гели на основе пТМК вероятно оказали на клетки токсический эффект, что выразилось в постепенной их гибели в течение эксперимента.

Таким образом, испытанные материалы на основе пТМК требуют дополнительной функционализации для улучшения биосовместимости, тогда как гидрогели на основе карбоксиалкильных производных хитозана и целлюлозы демонстрируют неплохие показатели для дальнейших исследований.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ TGF- β 1 IN VITRO

Мария Константиновна Корнейко, Ирина Александровна Ляхова, Сергей Викторович Алейцев, Игорь Степанович Брюховецкий

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

mari_korneiko@inbox.ru

Большинство современных методов лечения злокачественных опухолей головного мозга недостаточно эффективны, а средняя продолжительность жизни пациентов варьирует от 9 до 14 месяцев. Метастатические и инвазивные процессы являются основными характеристиками злокачественных опухолей. Наиболее важным патогенетическим механизмом является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который заставляет эпителиальные клетки терять свою апикально-базальную полярность, вследствие чего эти подвижные элементы приобретают способность проникать в окружающие ткани и мигрировать в отдаленные органы. Трансформирующий фактор роста- β 1 (TGF- β 1) играет особую роль среди механизмов, индуцирующих ЭМП. Роль TGF- β в этом процессе очень сложна. Согласно некоторым исследованиям, этот фактор, действуя в нормальных условиях, ингибирует пролиферацию клеток, блокирует жизненный цикл клетки, инициирует дифференцировку или апоптоз. В настоящем исследовании представлено взаимодействие между гемopoэтическими стволовыми клетками и клетками глиобластомы, стимулированными TGF- β 1 in vitro. Материалом для исследования были CD 34⁺ гемopoэтические стволовые клетки (HSCs), глиобластома U87 MG (ATCC® HTB-14™). Мы использовали методы культивирования клеток, роботизированный мониторинг межклеточных взаимодействий, конфокальную лазерную микроскопию, проточную цитометрию, электронную микроскопию. Было показано, что клетки U87 имеют сложную систему коммуникации, включающую адгезивные межклеточные контакты, области слияния с растворением цитоплазмы, слияние клеток, коммуникационные микротрубочки и микровезикулы. Влияние TGF- β 1 на клетки глиобластомы приводит

к изменению формы клеток и усилению их экзокринной функции. HSC мигрируют в клетки глиобластомы, взаимодействуют с ними и обмениваются флуоресцентной меткой. Стимуляция раковых клеток TGF- β 1 ослабляет их способность привлекать HSC и обмениваться с ними флуоресцентной меткой.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ИНДУКТОРОВ ДЛЯ МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Дарья Григорьевна Корovina, Ирина Петровна Савченкова

ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», Москва, Россия

darya.korovina@gmail.com

Несмотря на возрастающее число опубликованных исследований по миогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) человека, работ с использованием клеток крупных животных моделей, в частности сельскохозяйственных животных, в данной области все еще недостаточно. Поэтому целью данного исследования было определение оптимальных условий культивирования для дифференцировки в клетки скелетной мышечной ткани (СМТ) ММСК крупного рогатого скота (КРС) под влиянием различных индукторов.

В эксперименте использовали ММСК, выделенные нами ранее из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) КРС, на 4 пассаже и миобласты крысы L6J1 на 3 пассаже. Длительность всех протоколов дифференцировки составляла 28 сут. Согласно первому протоколу ММСК в течение 7 сут. культивировали в среде SKGM-2 с 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК), 2% эмбрионального экстракта мышечного мозга и антибиотиками пенициллином 50 ед./мл, стрептомицином 50 мг/мл. Далее использовали среду, стимулирующую слияние миобластов (смесь сред DMEM и F12 в соотношении 1:1, 2% сыворотки крови лошади и антибиотики). Во втором протоколе в качестве фидерного слоя для ММСК использовали инактивированные митомицином С миобласты L6J1. Клетки сокультивировали, используя только ростовую среду для ММСК (DMEM-LG, дополненная 10% СКПК и антибиотиками). Среды для дифференцировки по третьему протоколу состояла из среды для культивирования ММСК и 50% кондиционированной среды, полученной от клеток L6J1. В связи с отсутствием специфических антител, миогенный потенциал ММСК КРС оценивали методами фазово-контрастной микроскопии и ПЦР-РВ по уровню экспрессии генов-маркеров миогенеза *SM22 α* , *MyoD1* и *MyoG*.

Установлено, что применение первого протокола стимулировало появление как адипоцитов, так и образование миотрубочек, что подтверждалось высокой экспрессией генов *MyoD1* и *MyoG* в ММСК ЖТ. В ММСК КМ в случае использования данного протокола была выявлена наибольшая степень дифференцировки в клетки гладкой мышечной ткани. Показаны высокие уровни экспрессии гена *MyoD1*, характерного для стадии образования миобластов, в ММСК КМ и ЖТ как в системе сокультивирования, так и при добавлении кондиционированной среды. В целом, ММСК ЖТ обладали способностью к миогенной дифференцировке в ответ на индукционные стимулы

в гораздо большей степени, чем ММСК КМ. Наиболее высокий потенциал дифференцировки в клетки СМТ продемонстрирован при использовании в качестве индуктора среды, кондиционированной миообластами L6J1.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МИЕЛИНОВЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В КОНДУИТЕ НЕРВА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Анна Геннадьевна Коротких¹, Сергей Владимирович Сазонов^{1,2}

¹ Кафедра гистологии Уральского государственного медицинского университета, Екатеринбург, Россия;

² Патолого-анатомическое отделение Института медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

korotkich.hist@yandex.ru

Введение. Оценивали влияние одностенных углеродных нанотрубок в кондуите нерва на процесс регенерации миелиновых нервных волокон.

Материал и методы. Травму седалищного нерва наносили 15 лабораторным кроликам. На левой конечности (опыт) и правой (контроль) выделяли и пересекали седалищный нерв, на оба поврежденных нерва накладывали кондуит (тефлоновый сосудистый протез). В полость кондуита левой конечности помещали одностенные углеродные нанотрубки (Carbonnanotube, single-walled, carboxylicacidfunctionalized, Sigma-Aldrich, Германия). На правой конечности проводили аналогичное вмешательство, но нанотрубки не использовали. Через 6 месяцев, животных подвергли эктаназии. Из седалищных нервов изготавливали полутонкие гистологические срезы их дистальных и проксимальных отделов, окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрические измерения проводились с использованием программы CellSensStandart (Olympus Corporation, Япония) ув. 20×100. Измеряли диаметр миелиновых нервных волокон опытной и контрольной конечностей в дистальном и проксимальном участке нерва по двум осям. Также производился забор образцов для электронно-микроскопического исследования. Ультратонкие срезы получали на ультратоме «Leika EM UC6», контрастировали цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «Morgagni 268D». Всего было проведено исследование 18 образцов, взятых от 3 животных. Статистический анализ материала проводился с помощью программы Microsoft Excel 2019.

Результаты. Средний диаметр миелиновых нервных волокон опытная конечность: проксимальный участок нерва — 43,16±0,61 мкм; дистальный — 37,50±0,56 мкм; контрольная конечность: проксимальный участок — 32,63±0,57 мкм; дистальный — 18,73±0,20 мкм. Увеличение числа пролиферирующих нейрореммоцитов вокруг поврежденных нервных волокон опытной конечности говорит о стимуляции регенераторных процессов. В контрольной конечности, помимо меньшего диаметра миелиновых нервных волокон, обнаружены процессы дистрофии миелина и наличие лишь единичных нейрореммоцитов, в нервной ткани преобладают дистрофические изменения над процессами регенерации.

Выводы. Выявлены достоверные различия в диаметре регенерирующих миелиновых нервных волокон при использовании углеродных нанотрубок. При использовании одностенных углеродных нанотрубок средний диаметр миелиновых нервных волокон дистального участка нерва увеличивается, наблюдается более активная

пролиферация нейрореммоцитов и меньшая степень дистрофических изменений нервных волокон.

ТРЕХМЕРНАЯ КОНСТРУКЦИИ ХРЯЦА, ПОЛУЧЕННАЯ ИЗ АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Артем Владимирович Коротков¹, Евгений Александрович Шуман², Олег Германович Макеев¹, Елизавета Анатольевна Яковлева²

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

² ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

larim@mail.ru

Для терапии дегенеративных заболеваний дисков, не поддающихся консервативному лечению, прибегают к дискэктомии, обеспечивающей анкилоз соседних позвонков, межпозвонковому артродезу, спондилодезу или аллотрансплантации донорских дисков, обладающих достаточной иммуногенностью.

Еще одним способом терапии, разрабатываемым в настоящее время, является введение клеточной культуры хондробластов или их прекурсоров в область студенистого ядра.

Между тем, одной из важнейших проблем применения культивируемых клеток для восстановления хрящевой ткани является их крайне низкий энgraфтмент.

Поэтому одним из возможных подходов к решению проблемы лечения дегенеративных заболеваний межпозвонковых дисков может явиться интеграция в полость студенистого ядра менископодобной объемной тканеинженерной конструкции, полученной на основе направленной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выращенной на безматричной основе и соответствующей объему сформированной у пациента полости в области ядра диска.

В работе использовали ММСК, выделенные из жировой ткани передней брюшной стенки человека, полученной при липосакции аппаратным способом.

Фабрикацию тканевой конструкции проводили авторским методом с этапностью культивирования, позволяющей придать конструкции заданную форму и структуру. Последняя предусматривала моделирование конструкции, состоящей из слоев с различной степенью зрелости клеток — более зрелые и дифференцированные — в центре, молодые клетки — по периферии.

Полученная хрящевая конструкция в полной мере соответствует заданной форме диска размером 2.5–3 мм в высоту и 19 мм в диаметре. Имеет мягкую консистенцию по периферии, упругий центр и неравномерный розово-желтый цвет.

Хрящевые клетки в созданной конструкции находятся на различных стадиях дифференцировки: по периферии расположены предшественники хондробластов и юные хондробласты, имеющие отросчатую форму и небольшой размер. Созданная конструкция позволяет наблюдать этапность гистогенеза хряща, в частности в области перехода молодого хряща в зрелый происходит смена оксифильности (1 стадия развития хрящевой ткани) на базифильность основного вещества (2 стадия) с возвратом к оксифильности (3 стадия). Последняя стадия совпадает со временем появления фибрилл.

ОСТЕОГЕННАЯ ИНДУКЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЯХ ДИОКСИДТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

**Светлана Михайловна Космачева,
Михаил Петрович Потапнев**

*Лаборатория биологии и генетики стволовых клеток,
Республиканский научно-практический центр
трансфизиологии и медицинских биотехнологий,
Минск, Республика Беларусь*

4kosmacheva@mail.ru

Введение. Пористые наноструктурированные покрытия диоксидтитановых имплантатов могут быть использованы для контролируемого высвобождения биологически активных веществ, обеспечивающих жизнеспособность и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека.

Цель: изучить кинетику выделения биомолекул, обеспечивающих остеогенную дифференцировку МСК, из мезопористых наноструктурированных диоксидтитановых покрытий.

Материалы и методы. Использованы титановые пластины с анодированной пленкой нанотрубок диоксида титана (ТNT) и с соногенерированной мезопористой пленкой диоксида титана (ТMS). Загрузку в мезопоры покрытий растворов биомолекул проводили пятикратно в условиях вакуумного высушивания. Анализ высвобождения биомолекул проводили спектрофотометрически. Для дифференцировки МСК человека в остеогенном направлении дексаметазон и L-аскорбиновую кислоту инкапсулировали в поры TNT. МСК человека высевали в концентрации 30000 клеток/см² на подложку TNT с биомолекулами, покрытыми поочередно 7 слоями хитозана и полиактиловой кислоты. Пластины инкубировали в культуральной среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 2% АВ сыворотки крови человека, 10 мМ β-глицерофосфата, 0,1% гентамицина в течение 14 дней. Среду меняли каждые 2 дня. Эффективность остеогенной дифференцировки определяли методом ОТ-ПЦР по экспрессии mRNA генов остеокальцина и щелочной фосфатазы.

Результаты. Выделение биомолекул с поверхности диоксидтитановых покрытий спектрофотометрически имело две фазы: сначала наблюдалось ускоренное элюирование в течение 6 часов с последующим переходом к более медленной фазе элюирования, которая заканчивалась к 7–21 дню. Продолжительность выхода остеогенных индукторов с поверхности TNT вследствие большей толщины и однородности размера пор была длительнее на 7–14 дней, чем таковая из ТMS, поэтому остеогенную дифференцировку МСК проводили только на TNT. МСК человека, инкубированные на поверхности TNT/остеомолекулы/полимеры, экспрессируют более высокие уровни транскриптов щелочной фосфатазы и остеокальцина в сравнении с клетками, культивируемыми на поверхности TNT/полимеры или TNT/остеомолекулы.

Выводы. Наноструктурированное покрытие диоксидтитановых имплантатов в виде анодированных пленок нанотрубок с инкапсулированными остеогенными индукторами, покрытые полимерными оболочками, пролонгируют выделение биомолекул и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека в остеогенном направлении.

ИЗМЕНЕНИЯ В ЦИТОКИНОВОМ ПРОФИЛЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ СТЕПЕНЯМИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

**Александр Костенников, Маргарита Журавлева,
Ильяс Кабдеш, Эльвира Ахметзянова**

*Казанский (Приволжский) федеральный
университет, Казань, Россия;*

maldito.goldpride@gmail.com

Травмы спинного мозга остаются важной медицинской проблемой, подходы к решению которой не найдены до сих пор. В последнее время все больше исследователей подтверждают ключевую роль клеток микроглии в развитии посттравматических процессов при травме спинного мозга. В зависимости от микроокружения, микроглия может приобретать либо провоспалительный, либо противовоспалительный фенотип. В то же время, эти фенотипы способны к взаимному переходу. По этой причине, нашей целью стало исследование изменений в цитокиновом профиле сыворотки крови крыс со средней, легкой и тяжелой степенью травмы на третьи сутки.

Всем экспериментальным животным наносили дозированную контузионную травму легкой (1,5 м/с), средней (2,5 м/с) и тяжелой (4 м/с) степени при помощи Leica Impact One Stereotaxic Impactor. На третьи сутки после операции у животных забиралась кровь из хвостовой вены с последующим получением сыворотки. Полученные образцы сыворотки крови исследовались на концентрацию 40 цитокинов и хемокинов.

Полученные результаты показали, что у животных с тяжелой и средней степенью травмы содержание провоспалительных цитокинов было выше, чем у животных с легкой степенью повреждения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00141.

РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В ОБРАЗОВАНИИ РУБЦОВОЙ ТКАНИ

Елена Геннадьевна Костоломова

*ФГБОУ ВО Тюменский Государственный Медицинский
Университет Минздрава России, Тюмень, Россия*

lenakost@mail.ru

Раневой процесс — это единство воспаления, регенерации и фиброза. Сбой строго последовательных и протекающих зачастую одновременно процессов пролиферации и апоптоза возможно приводит к формированию патологических рубцов.

Цель. Изучить индекс пролиферации и апоптоза кератиноцитов и фибробластов кожи рубцовой ткани после оперативных вмешательств.

Материалы и методы. В качестве источника исследуемых клеток использовали биоптаты кожи, получены при операционном вмешательстве (блефаропластика) здоровых взрослых доноров, рубцовая ткань была получена от пациентов при иссечении послеоперационного рубца. Пролиферативную активность клеток изучали при помощи моноклонального антитела Ki-67. Для оценки процессов программированной клеточной гибели использовали моноклональные антитела к Fas-рецепторами (CD 95/Аpo 1), Bcl-2 и p53.

Результаты и обсуждение. Индекс пролиферации определяли при помощи Ki-67 (MIB-1), идентифицирующего ядерный антиген пролиферативных

клеток. Индекс пролиферации фибробластов составил $65,14\% \pm 0,01$ в рубцовой ткани и $27,14\% \pm 0,05$ в контроле, этот же показатель кератиноцитов кожи был равен $25,1\% \pm 0,01$ и $16,22\% \pm 0,04$ соответственно.

Присутствие на мембране клетки рецептора CD95⁺, свидетельствует о готовности ее к апоптозу. Экспрессия белка Fas на мембране фибробластов составила $46,22\% \pm 0,02$ в ткани рубца и $29,0\% \pm 0,01$ в контроле. Кератиноциты: рубец $37,23\% \pm 0,02$; контроль $19,5\% \pm 0,04$. Путем изменения транскрипции промитотических генов Bcl-2 поддерживается клеточный рост, что затрудняет вхождение клетки в клеточный цикл. По нашим данным, ингибитор апоптоза Bcl-2 присутствует в фибробластах: рубцов $46,11 \pm 0,03$; контроль $11,02 \pm 0,02$.

Главным фактором, запускающим каскад реакций, затрудняющих вхождение клетки в клеточный цикл, является белок p53. Активированный p53 способствует усилению экспрессии белка Bax и угнетает экспрессию Bcl-2. В здоровой коже p53 не выявляется. Получено, что как фибробласты, так и кератиноциты рубцов экспрессируют белок p53 $15,41 \pm 0,02$ и $11,15 \pm 0,0$ соответственно.

Заключение. 1. В рубцовой ткани наблюдается активная пролиферация фибробластов, апоптоз которых ингибируется Bcl-2. Возможно, такие фибробласты пролиферируют (обнаружены Ki-67⁺ позитивные клетки) и не вступают в апоптоз, что скорее всего является причиной образования рубца.

2. Несмотря на активно протекающие процессы пролиферации кератиноциты рубцовой ткани активно элиминируются апоптозом, что скорее всего сдерживает гипертрофию эпидермиса.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА СМЕШАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОК В ДОЛГОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

Наталья Валериевна Костюк¹, Михаил Витальевич Черноуцкий², Майя Борисовна Белякова³, Михаил Владимирович Миняев⁴, Маргарита Борисовна Петрова¹

¹ Кафедра биологии, Тверской ГМУ, Тверь, Россия;

² Кафедра патологической физиологии, Тверской ГМУ, Тверь, Россия;

³ Кафедра биохимии с курсом КЛД, Тверской ГМУ, Тверь, Россия;

⁴ Научная лаборатория, Тверской ГМУ, Тверь, Россия

po01637@mail.ru

Тестирование биосовместимых материалов для костных имплантов традиционно проводится с использованием монокультур остеобластов или их предшественников. При этом игнорируется тот факт, что в живом организме заселение имплантированных конструкций происходит при участии различных типов клеток. С этих позиций более адекватной экспериментальной моделью могли бы стать смешанные культуры клеток костной ткани. В данной работе изучали смену морфотипов в смешанной популяции остеогенных клеток в долгосрочной культуре.

Заселение искусственной поверхности клетками имитировали с помощью костных эксплантов (свод черепа крысы), прошедших многостадийную ферментативную обработку. Для ограничения экспансии фибробластов экспланты поддерживали на среде DMEM/F12 с добавлением глутамина, аскорбиновой кислоты и 10% FBS. Фрагменты ткани выдерживали в среде в течение 4 недель, после их удаления за культурой наблюдали еще 4 недели. Морфофункциональные изменения в культуре

оценивали с помощью световой микроскопии и гистохимических окрасок (ализариновый красный, серебро по Ван Косса, трихромовая окраска по Маллори).

В популяции вновь мигрирующих клеток доминировали мелкие шарообразные клетки иногда с небольшими тупыми выростами, обладающие плохой адгезией к культуральному пластику. Среди пластающихся были определены вытянутые фибробласты, кубические остеобласты и звездчатые остециты. К концу первой недели замечены широкораспластанные многоядерные клетки, морфологически сходные с остеокластами. Продолжительность их жизни была не велика, и в целом не превышала недели. По мере заполнения поверхности клетки формировали агрегаты гетерогенного состава. Внутри агрегатов обозначились зоны переуплотнения, созданные кубическими клетками, и рыхлые области, заполненные отростчатыми клетками. К началу второго месяца большинство клеток переходило в фазу секреторной активности, о чем свидетельствовало появление зернистости цитоплазмы, возникновение экстрацеллюлярной волокнистой сети. Отдельные крупные волокна коллагена провоцировали поляризацию примыкающих к ним клеток. К концу наблюдений фиксировались четкие области минерализации и разветвленные сети зрелых остецитов, запечатанных внутри лагун.

Проведенные исследования показали, что смешанная популяция остеогенных клеток в культуре проходит основные этапы, характерные для формирования кости *in vivo*. Предлагаемый подход может быть использован для разработки методов тестирования материалов для костных имплантов.

ПРИМЕНЕНИЕ СЕГНЕТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Валентин Валентинович Кочервинский¹, Олег Валерьевич Градов², Маргарита Алексеевна Градова²

¹ Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л.Я. Карпова, Москва, Россия;

² ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

camacsociety@gmail.com

В практике использования поливинилиденфторида (PVDF) и ряда его сополимеров как материалов для изготовления систем магнито- и электростимуляции тканей (PMID:31382332), способных к электрическому отклику на наномеханическое воздействие, а также отклику на пульсирующее электромагнитное поле скаффолдов (PMID:31339375) (как правило, волокнистых — получаемых технологиями электроспиннинга, в т.ч. нановолокнистых (PMID:28895062); реже — 3D-печатных композитных (PMID:30184807)) основную индукционно-биофизическую функцию выполняет электрофизика β-фазы, обеспечивающей высокие пиро- и пьезоэлектрические свойства PVDF (за счёт максимального дипольного момента). Сегнетоэлектрические полимеры на основе PVDF, имея текстуру поликристалла, после поляризации обнаруживают пьезоэлектричество с неклассическим механизмом, сохраняющимся длительное время.

Это позволяет рассматривать β-PVDF-скаффолд одновременно как сенсор и сонар — актуатор, реализующий как электрическое (электрофизиологическое), так и акустическое и (или) электроакустическое стимулирование ткани, а также регистрацию её собственных сигналов, что переводит контролируруемую регенерацию ткани с использованием PVDF в раздел особого рода тераностики,

где скаффолд сам является источником дескрипторов регенерации ткани, поддерживаемой им.

И если для применимости PVDF при регенерации костной ткани (PMID:31081968; 31016299) это встречается с трудностями интраостеальной регистрации сигнала, то для таких возбудимых систем, как: кардиомиоциты (PMID:26705272; 30593417); клетки желез (PMID:29630353); нервная ткань (PMID:27571576) (с учётом Шванновских клеток (PMID:29794323), миоциты мочевого пузыря (PMID:30030200; 28750602), это не является невозможным. Инжиниринг нервной ткани с индуцированной ориентацией ведётся на электроформованных микроволокнистых PVDF-скаффолдах (PMID:31261995; 28256789).

Электрический и (или) магнитоэлектрический (PMID:30613971) отклик возбудимой ткани может являться предметом бесконтактных неинвазивных измерений — таких, как электромиография (в том числе — с накожными электродами), ЭКГ и ЭЭГ, а также их магнитных эквивалентов: магнитомиографии, магнитокардиографии и магнитоэнцефалографии.

Имплементировать этот принцип для анализа отклика с учётом вклада реактивности «умного» PVDF-скаффолда (PVDF, по определению «Encyclopedia of Smart Materials» (DOI:10.1002/0471216275.esm063), относится к классу «smart materials»), с позиций современной метрологии, достаточно просто и рационально, как показывается в данном докладе.

ПРОТЕИНКИНАЗА G МОДУЛИРУЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МСК К ПУРИНЕРГИЧЕСКИМ АГОНИСТАМ

**Екатерина Николаевна Кочкина,
Полина Дмитриевна Котова**

Институт Биофизики Клетки РАН, ФИЦ Пущинский Научный Центр Биологических Исследований РАН, Пущино, Россия

kate-kochkina@yandex.ru

Первичная культура мезенхимных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани человека содержит субпопуляции клеток, специфически чувствительных к агонистам GPCR-рецепторов. Ранее нами было показано, что МСК генерируют Ca^{2+} -ответы на различные агонисты по принципу «все или ничего», т.е. в малых дозах агонист не вызывает изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки, тогда как при превышении пороговой концентрации инициирует глобальный Ca^{2+} -сигнал, величина и кинетика которого не зависит от концентрации агониста. Этот феномен обусловлен двустадийной трансдукцией сигнала, важную роль в которой играет механизм Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} из внутриклеточных депо (CICR). В изучении этого механизма важным является вопрос, каким образом регулируется порог инициации CICR, его мы и исследовали на примере пуринергической системы МСК, используя микрофотометрию и Ca^{2+} -индикатор Fluo-4.

Мы обнаружили, что неспецифический ингибитор фосфодиэстераз IBMX увеличивал пороговую концентрацию АТР. Так, среди пуринергических МСК ($n=54$), которые стимулировались АТР в концентрации 0.5–5 мкМ, 3 и 16 клеток ответили на агонист, использованный в дозах 0.5 и 1 мкМ соответственно, при этом в присутствии IBMX (50 мкМ) АТР инициировал Ca^{2+} -сигналы в МСК, только начиная с дозы 1,5 мкМ.

Наиболее универсальным путем регуляции клеточных функций циклическими нуклеотидами

является cAMP/cGMP-зависимое фосфорилирование различных белков, мы анализировали эффекты специфических ингибиторов PKA и PKG, H89 и KT-5823 соответственно. В общей сложности нами было проанализировано 13 клеток, которые генерировали Ca^{2+} -ответы на 1.5 мкМ АТР, обратимо блокирующиеся IBMX 50 мкМ. На фоне IBMX добавление во внеклеточный раствор H89 (2–4 мкМ) не восстанавливало чувствительность клеток к 1.5 мкМ АТР. Однако если МСК инкубировали в присутствии комбинации ингибиторов IBMX (50 мкМ) + H89 (4 мкМ) + KT-5823 (1 мкМ), то они сохраняли способность генерировать нормальные по форме и кинетике Ca^{2+} -сигналы в ответ на 1.5 мкМ АТР. Это свидетельствовало о том, что ключевую роль в ингибиторном эффекте IBMX играло увеличение активности PKG. Таким образом, полученные данные говорят о том, что PKG модулирует чувствительность МСК к АТР, вероятно, фосфорилируя IP3-рецепторы cGMP-зависимым образом.

Финансирование исследования: стипендия Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-924.2018.4.

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОХИРУРГИЯ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Настасья Владимировна Кошелева¹⁻³, Инна Вячеславовна Ильина⁴, Ирина Михайловна Зурина^{1, 3, 5}, Анастасия Алексеевна Горкун^{1, 3, 5}, Дмитрий Сергеевич Ситников⁴, Михаил Борисович Агранат⁴, Сергей Георгиевич Морозов¹, Петр Сергеевич Тимашев⁵⁻⁷, Ирина Николаевна Сабурина^{1, 3}

¹ ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;

² Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ ФГБУН Объединенный институт высоких температур РАН, Москва, Россия;

⁵ Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия;

⁶ ИФТ РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;

⁷ Отдел полимеров и композиционных материалов, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

n_kosheleva@mail.ru

При консерватизме ключевых механизмов регенерации их вклад в репарацию тканей и органов млекопитающих и человека изучен не до конца. Применение прецизионных лазерных технологий позволяет исследовать процессы заживления на клеточном и субклеточном уровнях. В модельных системах репарации *in vitro* на 2D культурах можно оценить только миграцию и пролиферацию. Переход к 3D культурам создает условия, приближенные к *in vivo*, когда клетки взаимодействуют друг с другом и с внеклеточным матриксом в трех измерениях. Одна из форм 3D культур — сфероиды, широко применяемые как в тканевой инженерии, так в качестве тест-системы. Целью исследования стала разработка доступной модели для изучения процессов репарации *in vitro* с использованием сфероидов и лазерной микрохирургии.

В работе использовали сфероиды из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга и дермальных фибробластов человека, полученные на планшетах с неадгезивными лунками (Microtissue, США). Повреждение наносили наносекундным лазерным микродиссектором Palm CombiSystem (Zeiss, Германия). Параметры лазерного излучения (длина волны 355 нм, частота импульсов 100 Гц, длительность импульсов 2 нсек, максимальная энергия в импульсе 9 мкДж) были оптимизированы для микродиссекции заданной области сфероида. Репарацию анализировали с применением прижизненной цейтраферной микроскопии, иммуноцитохимии и электронной растровой микроскопии.

В первые 5 мин после микродиссекции края разреза спонтанно раскрывались на угол более 180°. В месте разреза клетки погибали, нарушалась структура сфероидов, форма выживших клеток на границе повреждения менялась с вытянутой уплощенной на округлую. Через сутки происходило частичное восстановление сфероидов, клетки в поверхностных слоях начинали расплываться. Восстановление исходной структуры сфероидов с несколькими поверхностными слоями уплотненных клеток и полигональными клетками внутренней зоны происходило через 7 сут. без пролиферации за счет ремоделирования выживших клеток.

На разработанной модели было проверено действие синтетического пептида P199, входящего в состав одного из препаратов для омоложения кожи. Добавление P199 ускоряло репарацию сфероидов из дермальных фибробластов после микродиссекции — уже через 3 сут. происходило практически полное восстановление.

Модель повреждения сфероидов с применением лазерной микродиссекцией открывает новые возможности для изучения механизмов регенерации *in vitro*.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 18-15-00407).

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЕСНЫ КАК НОВЫЙ ИСТОЧНИК АУТОЛОГИЧНЫХ МИОБЛАСТОВ

Настасья Владимировна Кошелева¹⁻³, Ирина Николаевна Сабурова^{1,2}, Ирина Михайловна Зурина^{1,2,4}, Анастасия Алексеевна Горкун^{1,2,4}, Илья Игоревич Еремин¹, Андрей Алексеевич Пулин^{1,2,5}, Вадим Леонидович Зорин^{1,6}, Павел Борисович Копнин^{1,7}

¹ ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

³ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ Институт Регенеративной Медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия;

⁵ ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁶ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;

⁷ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

n_kosheleva@mail.ru

дифференцировке, остается основной проблемой заместительной терапии миодистрофий. Слизистая ротовой полости, обладающая высоким регенеративным потенциалом и онтогенетически включающая клетки нервного гребня может стать таким источником. Целью исследования стало изучение спонтанной миогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток слизистой оболочки десны (ММСК-д) в условиях 2D и 3D культур.

В 2D культуре ММСК-д имели фибробластоподобную форму, хорошо пролиферировали, по иммунофенотипу и дифференцировочному потенциалу соответствовали МСК. На 4 пассаже в 40% культур спонтанно происходила миогенная дифференцировка, формировались многоядерные миотубы, синтезировался один из ключевых регуляторов начальных стадий миогенеза — MyoD. Синтез саркомерного α -актина, характерного для дифференцированных мышечных клеток поперечно-полосатой и кардиальной мускулатуры, отсутствовал.

В 3D культуре, в сфероидах, полученных на неадгезивных агарозных планшетах (Microtissue, США) через 7 сут. наблюдали спонтанную дифференцировку ММСК-д в миогенном направлении. В дифференцированных сфероидах не синтезировался MyoD, отсутствовали единичные миотубы, зато формировались дифференцированные миофибриллы с характерным периферическим расположением ядер и поперечной исчерченностью, выявляемой окрашиванием антителами к белку саркомерного α -актина.

Кроме того, сравнение профиля секрета в 2D и 3D культурах ММСК-д выявило повышенный уровень проангиогенного фактора VEGF в кондиционированных сфероидами средах. В исследовании *in vivo* на модели повреждения икроножной мышцы кролика терапия суспензией ММСК-д уменьшала размер рубца, тогда как сфероиды из ММСК-д способствовали полноценному органотипическому восстановлению мышечной ткани.

Таким образом, установлен высокий миогенный потенциал ММСК-д. Культивирование в 3D условиях с формированием сфероидов эффективнее стимулирует спонтанную миогенную дифференцировку с образованием характерных для организованной мышечной ткани миофибрилл и активизирует секрецию VEGF, что может повысить выживаемость сфероидов в зонах повреждения. Сфероиды из ММСК-д могут стать альтернативным доступным источником миогенных клеточных продуктов для терапии миодистрофий.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 17-75-30066).

Поиск доступных аутологичных источников клеточного материала, способного к миогенной

РЕГЕНЕРАЦИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ В ОБЛАСТИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ

Ирина Александровна Красильникова¹,
Оксана Юрьевна Лисина², Максим Витальевич
Балаясин³, Ринат Рашидович Шарипов²,
Ш.К. Сулейманов³, Даниил Андреевич
Фролов⁴, Всеволод Григорьевич Пинелис¹,
Александр Михайлович Сурин^{1,2}

¹ ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России,
Москва, Россия;

² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»,
Москва, Россия;

³ ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
Москва, Россия;

⁴ ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический
университет» Минобрнауки России, Москва, Россия

surin_am@mail.ru

Исследовано влияние механического повреждения (царапины) на Ca^{2+} гомеостаз и функциональное состояние митохондрий в первичной культуре клеток коры головного мозга крысы, а также на регенерацию нейрональной сети в зоне повреждения. Немедленные ответы клеток смешанной нейро-глиальной культуры на царапину и формирование нейрональной сети после повреждения исследовали спустя 3 и 14 дней после посадки культуры (3, 14 ДВК) методами оптической микроскопии (флуоресцентной и в проходящем свете). Нанесение царапины вызывало быстрый транзитный рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и падение митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), амплитуда которых снижалась по мере удаления от царапины. При расстояниях >100 мкм от ее границ изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ не замечены. В $\sim 70\%$ клеток, имевших сильный рост $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$, эти изменения блокировал ингибитор NMDA-каналов МК-801. Измерения, выполненные на культурах, экспрессирующих генетически кодируемый флуоресцентный АТФ-сенсор, позволили предположить, что в оставшихся 30% клеток сильный рост $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$ могут быть вызваны активацией пуриnergических P_2X -рецепторов АТФ, выделившимся из поврежденных клеток. В «молодой» культуре (травму наносили на 3 ДВК) прорастание нейритов и миграция клеток в зону царапины из неповрежденной области начинались после латентного периода ~ 10 час. Эти процессы достигали наибольшей скорости на 2–3 день после нанесения царапины и завершались на 8–10 день после, когда зона царапины шириной 200–300 мкм была равномерно заполнена нейритами и клетками. В «зрелой» культуре (травму наносили на 14 ДВК) сначала происходило расширение зоны механического повреждения, которое сменялось миграцией глиальных клеток из неповрежденной области в зону царапины. Нейриты, прорастающие из неповрежденной области, имели меньший диаметр и в 2–3 раза меньшее количество на единицу поверхности. В отличие от нейритов, глиальные клетки зрелой культуры не пересекали зону царапины, создавая вдоль ее границ подвижное окаймление шириной около 50 мкм. Латентный период регенерации составил около суток. Таким образом, нанесение механической травмы в нейро-глиальной культуре вызывает быструю активацию ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа и, вероятно, пуриnergических P_2X -рецепторов. Регенерация зоны повреждения осуществляется в «молодой»

культуре за счет заполнения нейритами и диффузии клеток, а в «зрелой» — благодаря росту нейритов и процессу, напоминающему астроглиоз.

Поддержано грантом РФФ 17-15-01487.

ОПТИМИЗАЦИЯ КАЧЕСТВА ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ИХ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Виталий Викторович Краснов¹, Игорь
Васильевич Матвейчук¹, Владимир Викторович
Розанов^{1,2}, Юрий Юрьевич Литвинов¹

¹ ФГБНУ ВИЛАР, Москва, Россия;

² Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

v.v.krasnov@mail.ru

Оптимизация репаративной регенерации при устранении дефектов кости — актуальная и многофакторная проблема современной биоимплантологии. В её решении используются различные научно-методические подходы, позволяющие выяснить роль факторов, определяющих эффективность выполнения реконструктивно-восстановительных операций. Одним из них является состояние поверхности костных имплантатов.

Цель исследования: разработка инновационной технологии резания и изучения свойств поверхностного слоя костных фрагментов.

Исследование является продолжением работ [1, 2] по изучению состояния поверхностного слоя костных имплантатов и факторов, его определяющих, совершенствованию технологии изготовления костных имплантатов с целью использования её в практике тканевых банков, а также для изготовления костных образцов для решения различных задач биоимплантологии и биоматериаловедения. Для разделения костей человека, домашних и лабораторных животных на фрагменты заданных размеров и формы авторами разработаны и экспериментально апробированы инновационные технологии физико-механического резания с использованием полых цилиндрических, дисковых отрезных фрез и гидродинамической инцизии. Результаты исследований с применением предложенных в работе [1] критериев оценки морфофункционального состояния поверхностей костных имплантатов свидетельствуют о сохранении исходной структуры и физико-механических свойств костной ткани.

Сведения о структурно-функциональном состоянии поверхностного слоя представляют интерес при проведении контроля костных образцов после различных видов физико-химической обработки, имеющих место при получении имплантатов (демнерализация, деорганификация, лиофилизация и др.). В этой связи основные принципы разработанной методики изготовления и анализа состояния поверхности костных образцов могут быть прим.мы с учётом их реального физико-химического состояния.

Литература:

1. Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Розанов В.В. и др. Критерии оценки состояния поверхностей костных имплантатов. Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» 2010; 1: 63-4.
2. Матвейчук И.В., Литвинов Ю.Ю., Розанов В.В. Научно-методические основы объективной регистрации состояния поверхностей биологических объектов с использованием инновационных методов. Морфология 2016; 3: 135.

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫСЫ ПОСЛЕ ЗАПОЛНЕНИЯ ИСКУССТВЕННОГО ДЕФЕКТА КРИОГЕННО-СТРУКТУРИРОВАННОЙ БИОПОЛИМЕРНОЙ ГУБКой, СОДЕРЖАЩЕЙ БИОРЕГУЛЯТОР

Михаил Сергеевич Краснов¹, Астемир Икрамович Шайхалиев², Евгений Владимирович Коршаков², Виктория Петровна Ямскова³, Владимир Иосифович Лозинский¹

¹ ФГБУН институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова, Москва, Россия;

³ ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ ООО «Институт проблем биорегуляции», Москва, Россия

embrmsk@mail.ru

На модели экспериментального костного дефекта у крыс *in vivo* исследована индукция остеогенеза, вызываемая внесением в область дефекта макропористых криогенно-структурированных носителей на основе нетоксичных и биосовместимых полимерных 3D-матриц, сформированных из хитозана, альгината и сывороточного альбумина, с включением в них биорегулятора из сыворотки крови крупного рогатого скота. Всем этим матрицам свойственна широкопористая губчатая морфология, формируемая кристаллами льда в ходе криогенной обработки исходного раствора соответствующего биополимера. Данные материалы после включения БПК были протестированы как возможные остеоиндукторы и остеокондукторы на модели экспериментального дефекта кости у крыс *in vivo*. На ранних и поздних сроках эксперимента в разных группах наблюдали признаки костеобразовательной активности различной степени выраженности. Особенно она ярко проявлялась в опытных группах, когда применялись 3D-носители, содержащие биорегулятор. В этих группах наблюдали формирование костных балок с плотной костной тканью, формировании костного мозга, а также остеонов. Для всех типов, таких 3D-материалов, несущих биорегулятор, наблюдалась активная репарация кости, выражавшаяся в восстановлении плотной костной ткани, формировании костного мозга, восстановлении остеонов. В случае контрольных 3D-матриц без биорегулятора в основном формировалась плотная волокнистая ткань и губчатая кость. Полученные результаты свидетельствовали о полном восстановлении костной ткани именно при использовании криогенно-структурированных материалов в сочетании с сывороточным биорегулятором. Проведенное исследование выявляет принципиальную роль сывороточного биорегулятора в процессах остеоиндукции и остеокондукции, то есть в процессе ранозаживления кости. Это может быть связано со способностью данного биологически активного регулятора активировать клеточные источники регенерации соединительных тканей. Полученные в данной работе результаты позволяют рассматривать криогенно-структурированные биополимерные 3D-матрицы, содержащие биорегулятор, как перспективный материал для лечения различных переломов костей опорно-двигательной системы и в челюстно-лицевой хирургии.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий на 2018–2020 годы».

ПЛАНАРИИ КАК БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

Наталья Дмитриевна Крещенко

Институт Биофизики Клетки РАН, ФИЦ Пущинский Научный Центр Биологических Исследований РАН, Пущино, Россия

nkreshch@rambler.ru

Планарии занимают стратегическую позицию в эволюции. У них впервые возникает билатеральная симметрия, появляется третий зародышевый листок, формируется центральная нервная система. Помимо этого, планарии известны своей уникальной регенерационной способностью. Эта способность обеспечивается наличием у них плюрипотентных стволовых клеток, являющихся источником восстановления после ампутации, бесполого размножения, в ходе ежедневного клеточного самообновления. Использование планарий в качестве экспериментального объекта имеет неоспоримые преимущества. Их получение и содержание не требует больших затрат, на них возможна постановка множества экспериментов, удовлетворяющих любую статистику, для них ними разработаны и адаптированы современные методы микрохирургии, иммуноцитохимии, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. В настоящей работе исследовано распределение серотонин-иммунопозитивной (-ип) окраски в тканях интактных и регенерирующих планарий *Girardia tigrina* (Platyhelminthes). Серотонин-ип окраску наблюдали в центральных и периферических отделах нервной системы интактных животных. В головном отделе насчитывалось до 78 серотонин-ип клеток. Тела би- и мультиполярных серотониновых нейронов (17–28 мкм) располагались по дуге головного ганглия, от которого к переднему краю тела простирались серотонин-ип отростки. По 6–7 серотонин-ип клеток обнаружено вблизи фоторецепторов. Плотность серотонин-ип нейронов в головном отделе составила $5,89 \pm 1,5$ (n=26) на 100 мкм². Серотониновые нейроны и волокна выявлены в брюшных нервных стволах и поперечных комиссурах. Многочисленные серотонин-ип отростки образуют субмышечную и субэпителиальную нервную сети. К 24 ч после декапитации формировалась головная регенерационная бластема. К 2 сут. в бластеме появлялись тонкие нервные волокна, прорастающие из «старых» нервных стволов и субэпителиального плексуса. На 2–3 сут. в передней части бластемы бластеме появлялись мелкие слабо окрашенные серотонин-ип клетки. На 4–6 сут. продолжалось добавление нервных клеток и волокон в формирующийся головной ганглий, наблюдали усиление иммуноокраски дифференцирующихся нейронов. К 7 сут. новый ганглий по структуре соответствовал интактному, уступая ему лишь размером. Итак, в ходе регенерации происходило появление большего числа клеток и волокон, увеличение числа и размера нейронов, образование отростков. Усиление иммуноокраски отражало возрастающую продукцию серотонина в ходе созревания серотониновых нейронов.

Поддержано РФФИ № 18-04-00349а.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ МАТРИКСОВ КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ТЕСТАХ IN VITRO И IN VIVO

Анастасия Кручинина^{1,2}, Юлия Юдичева², Алексей Венедиктов²

¹ Кафедра «Общая биология и биохимия», Пензенский Государственный Университет, Пенза, Россия;

² ООО «Кардиоплант», Пенза, Россия

a.d.kruchinina@mail.ru

Разработка новых пластических материалов для регенеративной медицины остаётся актуальным направлением современных биомедицинских исследований. Децеллюляризованные матриксы ксеногенного происхождения находят широкое применение в качестве биодеградируемых носителей для клеток. Для их получения используют различные соединительнотканые структуры: перикард, подслизистая тонкой кишки, брюшина, глиссонова капсула печени, твердая мозговая оболочка, дерма, подслизистая мочевого пузыря и др. Свойства децеллюляризованных матриксов зависят от технологии удаления клеток донора и состояния внеклеточного матрикса после обработки. Материалы должны быть биосовместимыми, механически прочными, обладать низкой иммуногенностью, обеспечивать хорошую адгезию и рост клеточных культур.

Технологии производства децеллюляризованных матриксов, удовлетворяющих всем перечисленным требованиям, были разработаны и запатентованы компанией ООО «Кардиоплант» (Пенза).

Процесс изготовления включает в себя удаление клеток донора, обработку сшивающим агентом для улучшения физико-механических характеристик материала, лиофилизацию однослойных или многослойных тканевых конструкций.

Макроскопические и элетронномикроскопические исследования показали, что экспериментальные матриксы представляют собой децеллюляризованные лиофилизованные мембраны с высоким уровнем сохранения целостности волокон нативной соединительной ткани. Нерастворимые фибриллярные белки ткани определяют пространственную архитектуру и механические характеристики материалов.

Исследование биосовместимости in vitro показало сохранение жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека и фибробластов кожи человека, культивируемых на образцах. Выбор клеточных моделей обусловлен возможностью потенциального использования децеллюляризованных матриксов как для направленной регенерации мягких тканей (GTR), так и для направленной регенерации костной ткани (GBR).

Результаты гетеротопической имплантации показали отсутствие реакции отторжения в ответ на имплантацию образцов. Матриксы способны полностью замещаться собственными тканями организма, не вызывая воспалительную и дистрофическую тканевые реакции. Скорость биоинтеграции и резорбции зависит от технологии обработки и типа сырья для изготовления матрикса.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности полученных биоматериалов для разработки имплантатов, предназначенных для направленной регенерации тканей.

АНАЛИЗ 3D-РЕКОНСТРУКЦИЙ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫСЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ

Павел Андреевич Крылов

ФГАОУ ВО Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

p.krylov.volsu@yandex.ru

Для изучения морфологических изменений суставного хряща при остеоартрозе (ОА) используют гистологические методы, но развитие технологий за последние десятилетия позволяет получать 3D-реконструкции органов в натуральном цвете и размере. 3D-реконструкции коленного сустава при экспериментальном ОА позволят получить новые данные за счёт нивелирования цветовых искажений и геометрических параметров. Целью работы стал анализ изображений 3D-реконструкций при экспериментальном ОА коленного сустава крысы.

Работа проведена на 18 половозрелых белых крысах-самцах Вистар массой 250–300 г. ОА моделировали путём внутрисуставного введения крысам суспензии стерильного медицинского талька. Крысам выводили из эксперимента через 6 и 12 нед с помощью передозировки препарата Bioveta (200 мг/кг массы). Контрольную группу составили 6-ть интактных животных. Объектом для 3D-реконструкции стали костномышечные блоки коленных суставов крысы: от дистальных эпифизов бедренной кости до проксимальных эпифизов большеберцовой кости. При создании 3D-реконструкций была использована технология высокоточного послойного сошлифовывания в сочетании с цифровой съёмкой шлифов и программное обеспечение для создания виртуальной модели объекта-оригинала. Морфологические параметры оценивали с помощью программы ImageJ: радиальную толщину хряща (мкм), фактор поверхности хряща (безраз. вел.) и среднюю яркость хрящевого матрикса (усл. ед.). Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0, анализ различий между выборками использовали непараметрический критерий Фридмана.

В результате нами были получены 3D-реконструкции коленного сустава после моделирования экспериментального остеоартроза, на которых видны все структурные элементы коленного сустава, без геометрических искажений. На 6 неделе значение показателя рельефа суставной поверхности при экспериментальном ОА увеличилось на 7%, а на 12 неделе на 10% по сравнению со значением у интактных животных. По мере увеличения сроков экспериментов радиальная толщина снизилась в 1,5 раза по сравнению с интактной группой. Средняя яркость хрящевого матрикса снизилась в 4 раза по сравнению с интактной группой, но к 12 неделе увеличилась по сравнению с 6 недель в 2 раза. Таким образом, 3D-изображения суставного хряща коленного сустава позволяют оценить патологические изменения благодаря снижению дополнительных пространственных и цветовых искажений.

Работа частично выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-343003 p_мол_a.

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИНОМ

Екатерина Алексеевна Кувшинова¹, Наталия Валерьевна Петракова², Валентина Анатольевна Волченкова², Ирина Константиновна Свиридова¹, Сурая Абдулаевна Ахмедова¹, Наталья Сергеевна Сергеева¹, Владимир Сергеевич Комлев²

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал «Национального медицинского исследовательского центра радиологии», Москва, Россия;

² Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

beliay@mail.ru

Работа направлена на разработку методов функционализации керамических биоматериалов на основе октакальциевого фосфата (ОКФ) противоопухолевым препаратом цитостатического действия цисплатином. Цисплатин, обладает высокой токсичностью для основных систем органов и тканей человека. Поэтому поиск способов его адресной доставки в зону опухолевого роста является актуальной и клинически востребованной задачей.

Выбор ОКФ, в качестве платформы для адресной доставки цисплатина, обусловлен его ярко выраженными адсорбционными, а также остеокондуктивными и остеиндуктивными свойствами. Функционализацию ОКФ цисплатином производили адсорбционными методами с использованием солевых буферных растворов различного состава. Показано, что наибольшая эффективность инкорпорации достигается при выдержке биоматериала в растворе препарата в течение 2 суток, при этом доля встроенного препарата составила 41,9% от исходного содержания в растворе. С ростом концентрации цисплатина от 0,5 до 4,0 мг/мл не достигалось максимального насыщения керамики: количество встроенного препарата монотонно возрастало от 8,7 до 53,3 мкг на 1 мг ОКФ. При использовании различных инкорпорационных растворов максимальное количество препарата вошло в фосфатный буфер (PB), наименьшее — в пересыщенный кальцийфосфатный раствор (SCS). Динамика выхода цисплатина из функционализированного материала в модельную среду оказалась наиболее интенсивной в течение первых 7 суток наблюдения: высвобождалось 91,4–98,4% препарата (в зависимости от состава инкорпорационного раствора). Кривые выхода достигали плато к 50 суткам наблюдения. Наиболее равномерное высвобождение цисплатина было отмечено при инкорпорации в PB. Исследования *in vitro* показали, что функционализированный цисплатином ОКФ обладает специфическим цитостатическим действием в отношении клеточной линии рака молочной железы MCF-7. Однако активность цисплатина, инкорпорированного в ОКФ двумя способами (с использованием водного раствора и PB), была ниже в сравнении с активностью коммерческого препарата. Так, величина IC_{50} для цисплатина составила 21,0 и 19,3 мкг/мл при инкорпорации в водном растворе и PB (соответственно) и 8,1 мкг/мл — для коммерческого препарата.

Таким образом, был разработан метод функционализации цисплатином кальцийфосфатного материала, предназначенного для замещения костных дефектов в онкологии, с пролонгированным цитостатическим действием.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11052.

РЕКОНСТРУИРОВАННЫЕ ЛИПОПРОТЕИНЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Василий Андреевич Кудинов¹, Константин Константинович Баскаев²

¹ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия;

² НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

vasily.kudinov@biomedresearch.ru

В настоящее время микроРНК активно изучаются как эндогенные молекулы, участвующие в тонкой эпигенетической регуляции. В связи с открытием этого механизма регуляции появились новые возможности в области лечения наследственных и хронических заболеваний, а также для применения микроРНК в биомедицине. Очевидно, что для успешного применения микроРНК необходима разработка транспортных систем для их направленной доставки в клетки-мишени.

Недавно было обнаружено, что эндогенными транспортерами микроРНК в организме выступают липопротеины высокой плотности (ЛВП). ЛВП представляют собой фракцию липопротеинов крови, главной функцией которых является обратный транспорт холестерина из периферических тканей в печень. В то же время показано, что помимо классической функции ЛВП принимают участие в других биологических процессах, в том числе: транспорт эндогенных белков, витаминов, гормонов, нуклеиновых кислот, низкомолекулярных медиаторов, реализация иммунных реакций, вазодилатация и поддержание целостности эндотелия сосудов (Nafiane et al, 2013). Интересно, что частицы ЛВП могут быть реконструированы и получены *ex vivo*.

- ЛВП имеют ряд преимуществ в качестве системы доставки перед другими наночастицами (Kuai et al., 2016);
- ЛВП являются природными транспортерами в организме;
- ЛВП являются компонентами плазмы крови, имеют ультрамалый размер (8–30 нм);
- введение высоких доз ЛВП не вызывает побочных действия на организм;
- ЛВП могут использоваться для доставки веществ с разными физико-химическими свойствами;
- ЛВП могут взаимодействовать с клетками через специфические рецепторы и транспортеры (SR-B1, ABCA1 и ABCG1).

Особый интерес представляет использование ЛВП для доставки микроРНК в различные клетки и органы. Экспериментальная справедливость такого подхода показана для макрофагов атеросклеротической бляшки и целого ряда опухолей.

Таким образом, разработка и изучение реконструированных ЛВП в качестве систем доставки генотерапевтических конструкций представляет не только практический, но и фундаментальный научный интерес, как инструмент для изучения механизмов паракринного взаимодействия клеток. Такой подход имеет целый ряд преимуществ: возможность управляемого воздействия при очаговых патологических процессах (опухолевый рост, воспаление, ишемия), снижение токсичности препаратов и других побочных эффектов, повышение растворимости и стабильности препаратов, улучшение биосовместимости, контролируемое высвобождение препарата.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ НАРУШЕНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ВРЕМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Сергей Кузин

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

smkuzin@mail.ru

Генетическая нестабильность и связанный с ней риск злокачественной трансформации при использовании стволовых клеток являются следствием нарушения механизмов генетического гомеостаза. В настоящее время эти механизмы хорошо изучены на молекулярном и клеточном уровнях. Однако сложившееся при этом представление о том, что клетки с не репарированными генетическими нарушениями не могут пройти контрольные точки митотического цикла и подвергаются апоптозу, является во многом не верным и искажающим реальную картину.

Целью работы было изучение клеточно-популяционных механизмов гомеостаза, нарушение которых приводит к генетической нестабильности стволовых клеток. Данные, полученные нами при изучении пролиферации обновляющихся тканей после мутагенного воздействия, свидетельствуют о том, что часть клеток даже со значительными генетическими нарушениями способна проходить митотический цикл и неоднократно делиться. Элиминация таких клеток носит характер «естественного отбора» — они постепенно удаляются из популяции и заменяются на клетки без генетических нарушений. Показано, что одним из основных механизмов элиминации мутантных клеток является их переход в дифференцировку в результате нарушения в них временной организации процессов подготовки к делению. Такие клетки, рассинхронизированные с циркадианным ритмом пролиферативной активности, изменяют ориентацию оси митоза относительно базальной мембраны или других опорных структур. Это ведет к изменению пространственного расположения образовавшихся дочерних клеток — они выходят из ниши стволовых клеток, дифференцируются и в последующем элиминируются.

Действующий таким образом в обновляющихся тканях организма механизм генетического гомеостаза эффективен лишь при сохранении пространственно-временной организации ткани, и в частности, циркадианного ритма размножения клеток. При культивировании стволовых клеток нарушаются все условия, необходимые для функционирования этого механизма и сохранения генетической стабильности: изменяется как пространственная, так и временная структура клеточной популяции. Для увеличения количества стволовых клеток проводится принудительное подавление их дифференцировки, а в случае использования индуцированных клеток — их дедифференцировка. Это ведет к нарушению элиминации мутантных клеток, быстрому нарастанию их количества в популяции и увеличению вероятности последующей опухолевой трансформации.

ЛЕКАРСТВЕННО-НАПОЛНЕННОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ БАЛЛОНРАСШИРЯЕМЫХ СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ

Константин Анатольевич Кузнецов^{1,2}, Вера Сергеевна Черноносова^{1,3}, Борис Павлович Челобанов¹, Андрей Анатольевич Карпенко³, Павел Петрович Лактионов^{1,3}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;*

² *ГБУЗ Новосибирской Области Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия;*

³ *Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия*

lakt@niboch.nsc.ru

Данные многоцентровых исследований не выявили преимуществ стентов с лекарственным покрытием (СЛП) против голометаллических стентов (СГМ). В качестве альтернативе СЛП предложены стенты с внешней сеткой C-Gard (InspireMD, Inc). Лекарственно-наполненное мембранное покрытие металлических стентов может быть альтернативой для решения проблемы рестеноза.

Мембранное покрытие изготавливали методом электроспиннинга (ЭС) из растворов поликапролактона, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), паклитакселя (ПТХ) и диметилсульфоксида (ДМСО) в 1,1,1,3,3-гексафторизопропанол. Радиоактивно-меченый ПТХ получали термоактивированным обменом трития, и за его высвобождением следили при помощи сцинтилляционного бета-счета. Физико-химические свойства матриц характеризовали при помощи разрывной машины, сканирующей электронной микроскопии, определения угла смачивания. Кинетику высвобождения ПТХ *in vitro* в физиологическую плазму крови исследовали по высвобождению меченого тритием ПТХ. Покрытые стенты устанавливали в общую подвздошную артерию кроликов породы «Шиншилла» на сроки 1, 3 и 6 мес. Выполняли доплерометрию артерий н/к и постэксплантационное гистологическое исследование артерий с покрытыми стентами после заливки стентов в смолу "LR White Resin".

Показано, что материал покрытия стента представляет собой волокнистый матрикс с диаметром волокон $0,567 \pm 0,091$ мкм и пор $5,72 \pm 2,42$ мкм, областью эластической деформации 7%, пластической — 200–250%, с углом смачивания от $132,35^\circ$ до $88,89^\circ$. Оптимальным матриксом для доставки ПТХ является 5% ПКЛ с добавлением 10% ЧСА, 3% ДМСО и ПТХ, который имеет двухфазную кинетику высвобождения ПТХ и способен поддерживать близкую к цитотоксичной концентрацию ПТХ в стенке артерии в течение не менее 3-х мес. Покрытие стента равномерно распределено по поверхности стента, прочно связано с балками и позволяет устанавливать стенты с использованием устройства доставки катетер — баллона «Ангиолайн».

Биологических реакций отторжения и гемодинамически значимых стенозов стентов ни в одной из исследуемых групп, на всех периодах наблюдения не отмечено.

По результатам выполненного исследования покрытие сосудистых стентов, изготавливаемое методом ЕС из ПКЛ, ЧСА, ПТХ, и ДМСО можно рекомендовать для дальнейшей клинической апробации.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-15-00080 и проекта КП ФНИ СО РАН II.1 (ГЗ № 0309-2018-0014, АААА-А17-117112320047-5).

ВЛИЯНИЕ ОФРФ НА СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

Алла Викторовна Кузнецова^{1,2},
Любовь Александровна Ржанова¹,
Александр Михайлович Куринов¹

¹ Лаборатория проблем регенерации, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Лаборатория молекулярной клеточной патологии НИМСИ, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

avkuzn@list.ru

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) играет ключевую роль в развитии многих заболеваний глаз. оФРФ участвует в регенерации сетчатки из клеток РПЭ у низших позвоночных. Цель исследования: изучить влияние оФРФ на сигнальные пути и дифференцировку клеток РПЭ взрослого человека. По результатам морфометрического анализа под действием оФРФ при культивировании (24–120 ч) происходит уменьшение площади клеток и ядер РПЭ при увеличении ЯЦО, что говорит в пользу появления клеток меньшего размера и коррелирует со стволовостью. Изменения морфологии клеток РПЭ сопровождаются снижением их пролиферативной активности на ранних (24–48 ч) и повышением на поздних сроках (120 ч) после воздействия оФРФ, а также подавлением их дифференцировочного статуса, а именно снижением через 48–72 ч экспрессии мРНК РПЭ специфичных генов *MITF* и *KRT18* при одновременном увеличении экспрессии мРНК гена прогениторных клеток *NES*, и увеличением на сроке 72–120 ч экспрессии маркера нейроэпителия *OTX2* и генов-маркеров плюрипотентности *KLF4*, *OCT4* и *NANOG*. В период 48–120 ч после воздействия фактора отмечается снижение уровня экспрессии мРНК белка *BKM COL1A1*, указывающее на понижение синтетической активности клеток. Выявлена двухфазность действия оФРФ на *Wnt*/ β -катенин-сигнальный путь в клетках РПЭ, а именно инактивация его на ранних сроках (24–48 ч), что приводит к подавлению пролиферации и понижению дифференцировочного статуса клеток, и активация его на более поздних сроках (72–120 ч: снижение окрашивания на β -катенин и экспрессии мРНК *CTNNB1* и *GSK3B*), что ведет к усилению пролиферации малодифференцированных клеток. Под действием оФРФ через 72 ч происходит активация неканонического *Wnt*/*PCP*-сигнального пути, о чем свидетельствует усиление окрашивания на *Wnt7a*, а также повышение средних значений коэффициентов поляризации (вытянутости) клеток во временном промежутке 48–96 ч. На сроке 24–72 ч после воздействия фактора происходит инактивация *Notch*-сигнального пути (снижение экспрессии мРНК *NOTCH1*, *JAG1*, *HES1* и *HEY1*) и модуляция экспрессии белков семейства BMP (усиление ИЦХ окрашивания на *BMP2* и *BMP7* и изменение локализации *BMP4* при увеличении экспрессии мРНК *BMP2*, снижении экспрессии мРНК *BMP4* и *BMPR-II*). Таким образом, оФРФ модулирует *Wnt*-, *BMP*- и *Notch*-сигнальные пути в клетках РПЭ, что приводит к понижению уровня их дифференцировки в сторону нейроэпителия. Эти результаты уточняют механизм дедифференцировки клеток РПЭ при патологии и способствуют лучшему пониманию процесса регенерации сетчатки.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *OCT4* IN VIVO И IN VITRO

Андрей Кузьмин, Вероника Ермакова, Алексей Томили

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

a.kuzmin@incras.ru

Продукт гена *Oct4* (*Pou5f1*) — один из наиболее изученных факторов плюрипотентности. К настоящему моменту показано, что он является необходимым как для поддержания плюрипотентного статуса клеток, так и для его индукции из клеток дифференцированных. Кроме того, было показано, что эктопическая экспрессия *Oct4* позволяет фибробластам и клеткам крови трансдифференцироваться в нейрональные клетки без достижения стадии плюрипотентности. Таким образом, можно сказать, что *Oct4* увеличивает «пластичность» клеток, давая им возможность принять решение о дальнейшей дифференцировке. Эта способность объясняется тем, что *Oct4* является так называемым пионер-фактором, способным занимать участки закрытого хроматина, потенцируя их для дальнейшей активации другими факторами транскрипции и факторами ремоделирования хроматина.

Большой интерес представляет способность *Oct4* увеличивать клеточную пластичность не только на искусственных моделях, но и в реальных биологических случаях. Например, недавно было показано, что делетирование его промотера и первого экзона приводит к увеличению нестабильности бляшек на мышинной модели атеросклероза. При этом, способность гладкомышечных клеток, участвующих в формировании бляшки, мигрировать и проявлять свойства макрофагов (что является примером естественной пластичности) ингибируется. Кроме того, важным вопросом является участие *Oct4* в поддержании популяции раковых стволовых клеток внутри опухолей.

Для того, чтобы решить такого рода вопросы, мы создали генетическую систему, позволяющую *in vivo* и *in vitro*, в автоматическом режиме, маркировать клетки, которые когда-либо запускали экспрессию *Oct4*. Для этого, мы, при помощи системы CRISPR/Cas9 встроили сконструированные кассеты, содержащие сайт-специфические рекомбиназы и маркерные последовательности в два локуса эмбриональных стволовых клетки мыши — *Oct4* и *Rosa26*. Конструкция, встроенная в локус *Rosa26* служит спусковым крючком для сенсibilизации всей системы, после запуска которой, рекомбиназа, стоящая в локусе *Oct4*, автоматически активирует маркирование клеток, запустивших экспрессию *Oct4*.

Сейчас мы показали работу всей системы на эмбриональных стволовых клетках мыши, получили предварительные данные о запуске экспрессии *Oct4* в линии раковых клеток *Neuro-2a*, а также приступили к созданию линии мышей, содержащих нашу систему детекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РФФИ (грант № 14-50-00068), а также фонда РФФИ (грант № 17-00-00324).

ИММОРТАЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ДЕМОНСТРИРУЮТ СНИЖЕННЫЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В СРАВНЕНИИ С ПЕРВИЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Константин Юрьевич Кулебякин, Никита Сергеевич Волошин, Антон Александрович Картошкин, Дмитрий Кузьмич Мартынов
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

konstantin-kuleb@mail.ru

В настоящее время в биомедицинских исследованиях наметился тренд на использование первичных клеток человека, immortalized при помощи теломеразы (TERT), как моделей для изучения функции соответствующих тканей. Данные клетки активно внедряются как замена первичным клеткам доноров, которые имеют ряд недостатков: вариабельность от донора к донору, риск контаминации, ограниченная возможность пассирования, этические вопросы. Таким образом, immortalized клеточные линии представляют собой удобную альтернативу, занимая промежуточное положение между трансформированными линиями и первичным материалом.

Большое распространение immortalized клетки получили в сфере изучения функций постнатальных стволовых клеток. Данные клетки играют ключевую роль в поддержании постоянства состава и функции тканей человека. Основными механизмами, определяющими активность постнатальных СК в ткани, являются их непосредственная дифференцировка в функциональные клетки ткани, а также продукция паракринных и аутокринных факторов, регулирующих гомеостаз окружающих клеток. Ранее, в нашей лаборатории было показано, что immortalized линии МСК демонстрируют нарушенную гормональную чувствительность. В то же время, в настоящий момент существует крайне мало исследований, посвященных вопросу: насколько сильно изменяются дифференцировочные свойства первичных клеток при immortalization. В ходе данной работы мы сравнили дифференцировочный потенциал immortalized клеток и первичных МСК в классических для этих клеток направлениях: адипогенном и остеогенном.

Мы обнаружили, что несмотря на то, что immortalized МСК сохраняют принципиальную способность к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении, эффективность дифференцировки данных клеток значительно снижена по сравнению с первичной культурой клеток, полученной от донора. Таким образом, использование immortalized клеточных линий как альтернативы первичной культуре в биомедицинских исследованиях требует постановки дополнительных контролей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека».

СНИЖЕННЫЙ АДИПОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МСК, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ДОНОРОВ С ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Константин Юрьевич Кулебякин, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Никита Сергеевич Волошин, Александра Владимировна Степанова

Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

konstantin-kuleb@mail.ru

Поддержание постоянства состава и функции жировой ткани зависит от активности особой популяции постнатальных стволовых клеток — мезенхимных стволовых и (или) стромальных клеток. В норме эти клетки обеспечивают обновление жировой ткани за счет своей пролиферации и дифференцировки, продуцируют внеклеточный матрикс, а также контролируют тканевый метаболизм за счет продукции паракринных и аутокринных сигнальных молекул. Активность МСК находится под строгой нейро-гормональной регуляцией, что обеспечивается широким спектром рецепторов на поверхности этих клеток, позволяющим им воспринимать сигналы как от нейромедиаторов из ЦНС, так и от системно действующих гормонов. Нарушение гормональной регуляции является ключевым патогенетическим звеном развития заболеваний жировой ткани, затрагивающим не только метаболические процессы в ней, но и процессы клеточного обновления за счет дифференцировки МСК. Одним из самых распространенных нарушений гормональной чувствительности является инсулинорезистентность и сопряженный с ней сахарный диабет второго типа. Несмотря на установленную роль инсулина в контроле адипогенной дифференцировки МСК, крайне мало известно об изменении их дифференцировочного потенциала и функциональных свойств при развитии инсулинорезистентности. Это, наряду с распространением использования МСК, как перспективного объекта в регенеративной медицине делает задачу установления связи между состоянием инсулинорезистентности и изменением свойств МСК крайне актуальной.

В нашей работе мы сравнили дифференцировочный потенциал и паракринную активность МСК, полученных из здоровых доноров и из доноров с инсулинорезистентностью. Мы установили, что МСК полученные от доноров с инсулинорезистентностью обладают сниженной способностью к адипогенной дифференцировке. В то же время добавление кондиционированной среды от дифференцирующихся МСК здорового донора к клеткам от донора с инсулинорезистентностью повышает их способность к дифференцировке в адипоциты. Это позволяет предположить, что при инсулинорезистентности происходит нарушения продукции паракринных факторов, контролирующих дифференцировку в популяции МСК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека».

ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧНЫХ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКИ-МИШЕНИ С ПОМОЩЬЮ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

Сирина Василевна Курангалеева, Ольга Андреевна Неустроева, Альберт Анатольевич Ризванов, Марина Олеговна Гомзикова

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

kurbangaleeva_s@mail.ru

Клеточная терапия на основе мезенхимных стволовых клеток (МСК) несет большие риски. Однако везикулы, высвобождаемые МСК, имеют на поверхности те же рецепторы, что и родительские клетки и обладают тем же терапевтическим эффектом. Более того, они несут рисков онкотрансформации и являются безопасным терапевтическим инструментом. Метод, разработанный Pick *et al.*, позволяет получить индуцированные микровезикулы (МВ) с помощью цитохалазина В (ЦВ) в большом количестве, за счет блокировки полимеризации актиновых микрофиламентов цитоскелета. МВ-ЦВ являются перспективным вектором для доставки различных лекарственных веществ и наночастиц. Наличие клеточных мембран, которым окружены МВ-ЦВ, обеспечивают более естественный подход к задачам инкапсуляции и доставки *in vivo*.

Естественные микровезикулы могут переносить растворимые факторы, а также поверхностные рецепторы путем слияния цитоплазматических мембран. Однако способны ли искусственные микровезикулы, полученные с помощью цитохалазина В, к доставке специфичных мембранных рецепторов в клетки-мишени исследовано до настоящего времени не было. Поэтому мы оценили перенос поверхностного рецептора, специфичного для МСК, к клеткам-реципиентам HEK293FT, у которых отсутствует экспрессия выбранного рецептора, с помощью искусственных микровезикул.

МВ-ЦВ были получены из МСК, выделенных из жировой ткани человека. Морфологию и размер МВ-ЦВ МСК человека анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. МВ-ЦВ МСК имели сферическую структуру и размеры от 100 до 2600 нм. Однако основная часть (89,36%) входила в диапазон от 100 до 1200 нм.

Клетки HEK293FT предварительно окрашивали флуоресцентным мембранным красителем DiO и культивировали в течение 24 часов с DiD-мечеными МВ-ЦВ МСК. Экспрессия CD90 (Thy-1) была выбрана для демонстрации переноса рецептора, поскольку она специфична для МВ-ЦВ МСК и отсутствует на клетках HEK293FT. Экспрессию CD90 анализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 780 и проточной цитофлуориметрии BD FACS Aria III. Мы обнаружили, что мембраны МВ-ЦВ МСК и HEK293FT слились, и поверхностный рецептор CD90 был перенесен на клетки HEK293FT. Мы определили, что 99,14% клеток-реципиентов HEK293FT приобрели CD90⁺ иммунофенотип.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что МВ-ЦВ МСК переносят поверхностные рецепторы к клеткам-реципиентам HEK293FT.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 18-75-00090.

СТРУКТУРНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, БИОСОВМЕСТИМОСТЬ, БИОДЕГРАДАЦИЯ И ТКАНЕВАЯ РЕАКЦИЯ НА ИМПЛАНТАЦИЮ КОЛЛАГЕНОВЫХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Александр Витальевич Курков¹, Анна Евгеньевна Гуллер^{1,2}, Леонид Прокофьевич Истранов¹, Елена Викторовна Истранова¹, Семен Николаевич Чурбанов¹, Петр Сергеевич Тимашев¹, Денис Викторович Бутнару³, Анатолий Борисович Шехтер¹

¹ *Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;*

² *Высшая школа биомедицинской инженерии, Университет Нового Южного Уэльса, Сидней, Австралия;*

³ *Научно-Технологический Парк Биомедицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия*

a.shehter@yandex.ru

Введение. На сегодняшний день в медицине остро стоит вопрос о разработке адекватных тканеинженерных конструкций. Использование скаффолдов на основе коллагена является перспективным направлением регенеративной медицины. Мы проводили изучение структуры и механических свойств, биосовместимости, биодеградации и тканевой реакции при имплантации *in vivo* 14 оригинальных скаффолдов на основе коллагена для тканевой инженерии.

Методы. Изучены пористые материалы, реструктурированные из растворов коллагена, гибридные скаффолды из коллагена и викариловой сетки, подслизистая основа тонкой кишки (SIS) свиней, а также — дерма кожи коров и лошадей, перикард, стенки артерии и вены, мочевого пузыря, мочеоточника и уретры, децеллюляризованные с помощью фермента «Терролитина» и лиофилизированные. Из гибридного скаффолда и стенок артерий формировали протезы, которые имплантировали в дефекты уретры у 10 кроликов. Остальные скаффолды имплантировали подкожно и на раневую поверхность 245 крысам. Животных выводили из эксперимента на сроки от 5 до 90 суток. Образцы нативных и имплантированных скаффолдов с окружающими тканями изучали с помощью гистологических методов, нелинейно-оптической, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Кроме того, исследовали механические свойства скаффолдов до имплантации.

Результаты. Все изученные нами скаффолды показали хорошую биосовместимость и отсутствие реакции отторжения. Биодеградация коллагена в их составе сопровождалась его макрофагальной и гигантоклеточной резорбцией с замещением материала сначала грануляционной, а затем — зрелой соединительной тканью. Сроки биодеградации скаффолдов различались (от 10 суток до 3 месяцев), что было связано с особенностями молекулярной и надмолекулярной структуры коллагена и корелировало с их биомеханической прочностью.

Обсуждение. Полученные результаты указывают на то, что децеллюляризованные ткани и гибридный скаффолд полностью соответствуют требованиям тканевой инженерии в разных сферах регенеративной медицины, в том числе — для протезирования трубчатых органов. Пористые коллагеновые скаффолды с клетками и без клеток оптимальны для раневых покрытий, тампонад, пластики мягких тканей и в тех случаях, когда не требуется механическая прочность и длительное время резорбции.

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ТЕСТИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОВИРУСОВ

Александр Владимирович Лайков, Юлия
Джафаровна Романова, Дилара Зильбаровна
Гатина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов

*Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Казань, Россия*

sal.ilnur@gmail.com

Вирусные вектора используются в качестве средств доставки в протоколах генной терапии, при этом, качество капсидных белков является неотъемлемой частью безопасности и эффективности этих продуктов. В настоящее время, наиболее распространенными векторными системами используемыми в генной терапии являются различные серотипы аденовирусов. Целенаправленное манипулирование геномом аденовирусов позволяет создавать на их основе вектора для экспрессии широкого спектра белков. Создание, очистка и тестирование рекомбинантных аденовирусов является трудоемким, дорогостоящим этапом производства генно-терапевтических препаратов. В этой связи, методы постгеномного анализа все чаще начинают использоваться для тестирования рекомбинантных аденовирусов. В частности, методы протеомного анализа базирующиеся на подходах масс-спектрометрии, для определения компонентного состава синтезированных вирусных частиц, и что не менее важно, для выяснения загрязнения препаратов остаточными клеточными компонентами после их очистки.

В текущем исследовании с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии комбинированной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) мы проводили белковое профилирование созданных и очищенных рекомбинантных аденовирусов кодирующих различные проангиогенные и нейротрофические факторы (VEGF, GDNF, FGF2, SDF1 и др.). Для очистки вирусов были использованы стандартные методы градиентного центрифугирования в плотности цезия. Вирусные белки фракционировали в полиакриламидном геле и расщепляли трипсином, далее проводили масс-спектрометрический анализ в формате ВЭЖХ-МС/МС. В ходе которого нами было установлено, что созданные и очищенные вирусные частицы ожидаемо содержат белковые компоненты характерные для аденовирусов пятого серотипа. В частности выявлены коровые (pV, pVII, pX), капсидные (pII, pIIIa), вершинные (pIII, pVI) белки. Дополнительно нами были выявлены остаточные белковые компоненты клеток — потенциальные пирогенные и иммуногенные индукторы.

Таким образом, высокочувствительные методы масс-спектрометрического анализа могут быть легко реализуемы для тестирования генно-терапевтических систем содержащих в своем составе компоненты вирусных белков, а также определения чистоты получаемых препаратов. Методология позволяет развивать таргетные подходы анализа с целью количественной оценки концентрации вирусных частиц и различных контаминантов.

Поддержано РФФИ и Правительством РТ в рамках проекта № 18-44-160029.

ВЛИЯНИЕ ВАРИАНТОВ ВВЕДЕНИЯ ЦИАНОКОБАЛАМИНА НА ПОСТРЕЗЕКЦИОННУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Анастасия Юрьевна Лаптиева, Александр
Алексеевич Андреев, Антон Петрович Остроушко

*ФГБОУ ВО Воронежский государственный
медицинский университет им. Н.Н. Бурденко,
Воронеж, Россия*

laptievaa@mail.ru

Введение. Резекция печени — один из основных методов, позволяющий добиться радикального излечения больных с паразитарными и опухолевыми образованиями печени. Но острая послеоперационная печеночная недостаточность является одним из основных жизнеугрожающих осложнений и встречается в 15–45% случаев.

Цель. Усиление репаративной регенерации печени при резекции в эксперименте путем интраоперационного внутривенного введения цианокобаламина.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 96 половозрелых самцах крыс линии Wistar в 4 группах по 24 животных. Во всех группах выполняли типичную резекцию печени в объеме ~70% от исходной массы. Во 2 контрольной группе интраоперационно в сохраненные доли печени вводили 0,9% раствор хлорида натрия, во 2 опытной — цианокобаламин (конц. 200 мкг/мл) в суммарной дозе 1 мл.; в 1 опытной — 1 мл цианокобаламина (конц. 200 мкг/мл) вводился внутривенно. На 1, 5, 7 и 14 сутки после операции изучали массу регенерировавшей печени, биохимические показатели крови, проводили гистологические, иммуногистохимические и статистические исследования.

Результаты. На 5 сутки масса печени составила: в 1 контрольной группе — 49,12±3,14% от исходной, 2 контрольной — 48,77±2,56%, 1 опытной — 48,25±2,03%, 2 опытной — 55,11±1,89%. На 7 сутки в опытных группах восстанавливалось более 70% от исходной массы печени (1-я опытная — 71,25±3,05%, 2 опытная — 77,03±2,15%), в контрольных группах менее 65% (1 контрольная — 60,21±3,01%; 2 контрольная — 63,8±1,15%). К 14 суткам после операции наблюдалось практически полное восстановление исходной массы печени только во 2 опытной группе — 94,27±3,24.

Нормализация биохимических показателей к 14 суткам исследования наблюдалась в контрольных группах у 31,05±3,15% животных, в 1 опытной — 46,69±2,48%, во 2 опытной — 71,23±3,14%.

Повышение содержания IL-β отмечалось на 7 сутки во всех группах, максимальное значение наблюдалось во 2 опытной — 89,33±6,21 пг/мл.

На 14 сутки индекс пролиферации (Ki-67) гепатоцитов составил в 1 опытной группе 3,85%±0,48%; во 2 опытной — 6,22%±0,54; в 1 контрольной — 2,54±0,29%; во 2 контрольной — 2,56±0,45%.

Выводы. Внутривенное введение цианокобаламина является наиболее эффективным способом стимуляции репаративной регенерации печени, так как к 14 суткам после операции способствует восстановлению не только анатомической целостности печени, но и нормализации ее функциональной активности.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ НЕЙРОНАЛЬНЫХ, ГЛИАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Георгий Евгеньевич Леонов¹, Диана Ирековна Салихова^{1,2}, Татьяна Борисовна Бухарова¹, Зоя Валентиновна Корниенко¹, Наталья Вадимовна Булатенко¹, Олег Владимирович Махнач¹, Андрей Витальевич Макаров², Тимут Хайсамутдинович Фатхудинов^{2,3}, Сергей Львович Киселев^{1,4}, Дмитрий Вадимович Гольдштейн^{1,3}

¹ ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, Москва, Россия;

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия;

³ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

⁴ ФГБНУ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

golerus@gmail.com

Введение. Лечение неврологических заболеваний, таких как ишемический инсульт, спинальная травма не имеют эффективного лечения и до сих пор остаются частыми причинами смертности и инвалидизации. Перспективным направлением служит клеточная терапия, одним из механизмов действия которой может являться секреция трансплантированными клетками биологически активных факторов. Целью исследования является изучение нейропротективных и нейротрофических свойств нейрональных предшественников (НП), глиальных предшественников (ГП), полученных путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в моделях глутаматной токсичности и при направленной дифференцировке.

Материалы и методы. Исследование проводили на линии феохромоцитомы крысы (PC-12). Использовали кондиционированные среды (КС) НП, ГП и ММСК, полученные после 12 часов культивирования в среде DMEM/F12, (содержание общего белка 0,5 мг/мл). Для моделирования глутаматной токсичности клетки PC-12 культивировали в среде DMEM с 10% ЭТС в 96-луночном планшете. За 24 часа до добавления глутамата в лунки вносили КС, затем добавляли глутамат (10 мМ). Через 24 часа проводили МТТ тест и окрашивание Hoechst 33342. Для дифференцировки клетки PC-12 культивировали в среде OptiMem с 1% ЭТС в 24-луночном планшете. На 6 сутки после добавления КС оценивали количество и среднюю длину нейритов.

Результаты. В условиях глутаматной токсичности жизнеспособность клеток PC-12 увеличивалась при добавлении КС ГП на 21±5%, а КС ММСК — на 10±3%, количество апоптотических клеток уменьшилось с 11±3% до 4±2% и до 7±2% соответственно. КС НП не оказала значимого действия по сравнению с контролем. При направленной дифференцировке в образцах с добавлением КС ГП выявлено увеличение количества и средней длины нейритов (154% от контроля). При добавлении КС ММСК изменений по сравнению с контролем не выявлено, а КС НП, напротив, заведляла нейритогенез (57% от контроля).

Выводы. В моделях in vitro показано, что КС ГП оказывает нейропротекторное и нейротрофическое действие, превосходящее по эффективности влияние КС ММСК и НП. Полученные результаты являются обоснованием терапевтических эффектов ГП и служат основанием для разработки новых методов клеточной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417XO184).

НЕЙРОРЕПАРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ПРИВИТОГО СОПОЛИМЕРА ХИТОЗАНА С ОЛИГО (L,L-ЛАКТИДОМ) И ИПСК ЧЕЛОВЕКА В МОДЕЛИ ТРАВМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ

Наталья Владимировна Лизунова^{1,2}, Занда Валериевна Бакаева¹, Екатерина Андреевна Ивукина³, Вячеслав Игоревич Дамулин³, Артемий Александрович Шлычков^{1,2}, Никита Владимирович Минаев⁴, Татьяна Сергеевна Демина³, Ксения Николаевна Бардакова³, Петр Дмитриевич Брежестовский⁵, Петр Сергеевич Тимашев³, Всеволод Григорьевич Пинелис¹, Александр Михайлович Сурин^{1,6}

¹ ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», Москва, Россия;

² Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва Россия;

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.И. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

⁴ Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН, Москва, Россия;

⁵ Institut de Neurosciences des Systemes, UMR INSERM 1106, Marseille, France;

⁶ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

natalia.lizunova18@mail.ru

В работе изучали нейрорепаративное влияние тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе привитого сополимера хитозана с олиго (L,L-лактидом) in vivo в условиях сенсомоторного дефицита, вызванного травмой мозга. У мышей 8-недельного возраста, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемый флуоресцентный Сl-сенсор, удаляли участок мозга (Ø2 мм × 1,5 мм в области 1S и 1M коры) и имплантировали ТИК, на которые предварительно высаживали нокаунтные по генам HLA человеческие ИПСК, индуцированные в нейроны. Краниотомию закрывали покровным стеклом, к черепу мыши, используя стоматологическую пластмассу и прозрачный полимер, крепили устройство для фиксации в установке для широкопольного оптического имиджинга (WFI, NeuroTag, Финляндия). Данная методика обеспечивала визуализацию поверхности головного мозга, включая область травмы, в течении >30 дней. Для оценки неврологического дефицита проводили тест «Цилиндр» до травмы и на 2, 7 и 14 сутки после нее. Максимальный неврологический дефицит (~35% для травмированной стороны у мышей без ТИК) наблюдали на вторые сутки после операции. Восстановление функций происходило быстрее у животных с ТИК: на 7 сутки разница между группами составила не менее 5%.

Вживление ТИК не вызывало появления визуальных признаков воспаления или отторжения. При помощи установки WFI нам удалось обнаружить спонтанные флуктуации внутриклеточной концентрации Cl^- ($[Cl^-]$), а также изменения, вызванные электрической стимуляцией конечностей (60Гц, 5–20В) у анестезированных животных. Стимуляция стороны тела, ипсилатеральной интактному полушарию, вызывала в нём снижение $[Cl^-]$, тогда как стимуляция контралатеральной стороны приводила к увеличению $[Cl^-]$. В зоне повреждения у мышей с ТИК не наблюдалось реакции на стимуляцию любой из сторон, тогда как у животных без ТИК была направленность, противоположная интактному полушарию. У животных без ТИК было замечено увеличение активности зон неповрежденного полушария при стимуляции ипсилатеральной стороны, что может указывать на уменьшение степени латерализации функций мозга. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами, рекомендуемыми Российской ассоциацией по работе с лабораторными животными.

Заключение. Показана возможность изучения внутриклеточного гомеостаза ионов хлора в мозге анестезированной мыши. Показана биосовместимость и нейрорепаративный потенциал ТИК из гидрогеля на основе сополимера хитозана с лактидом в экспериментах *in vivo*.

Поддержано грантом РНФ 17-15-01487.

СЕРДЕЧНЫЕ ТЕЛОЦИТЫ: РОЛЬ В РЕПАРАЦИИ/РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА

Юлия Владимировна Лискова¹, Александр Абрамович Стадников¹, Антон Николаевич Новиков², Светлана Петровна Саликова³

¹ ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

² ГБУЗ «ГКБ № 1» г. Оренбурга, Оренбург, Россия;

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

alexander.stadnikov@yandex.ru

Одной из перспективных стратегий лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности (ХСН) считается клеточная терапия. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования демонстрируют неоднозначные результаты при трансплантации стволовых клеток в миокард. Данное обстоятельство повернуло вектор исследований в сторону изучения стимуляторов кардиомиогенеза и микроокружения прогениторных клеток сердца. В связи с этим возрос интерес к изучению особых интерстициальных клеток — телоцитов (Тц). Установлено наличие Тц в субэпикардальных нишах миокарда взрослых грызунов и человека. Способность сердечных Тц экспрессировать CD34, CD117, vimentin, а также маркеры стволовых клеток Nanog и Sca-1, позволило выдвинуть суждение о наличии у них плюрипотентных свойств и активного участия Тц в регенерации/репарации миокарда.

Целью нашего исследования стало изучение роли сердечных телоцитов в реорганизации миокарда пациентов с ХСН. Материалом исследования служили биоптаты миокарда ушка правого предсердия (УПП), полученные в процессе кардиохирургических операций (КХО) у 60 пациентов мужского пола с ХСН I (n=25) и IIА (n=35) стадией и мужчин (n=7) без патологии сердца. Миокард УПП изучен светооптическим, иммуноцитохимическим (оценка коэкспрессии CD-34/vimentin — идентификация Тц) и морфометрическими методами. Развитие

сердечно-сосудистых осложнений у пациентов после КХО считалось неблагоприятным исходом. Установлено, что в миокарде УПП контрольной группы объемная плотность (ОП) Тц составила $16,76 \pm 3,23$, ОП кардиомиоцитов (КМЦ) $79,08 \pm 7,36$, ОП капилляров $19,15 \pm 3,47$ об.%; в группе с благоприятным исходом КХО (n=42) ОП Тц — $20,94 \pm 3,12$, ОП КМЦ $67,08 \pm 8,21$, ОП капилляров $16,49 \pm 4,69$ об.%; в группе с неблагоприятным исходом КХО (n=18) ОП Тц — $6,46 \pm 3,58$, ОП КМЦ — $56,93 \pm 10,78$, ОП капилляров $11,00 \pm 3,72$ об.%. У пациентов с благоприятным исходом КХО наблюдалось увеличение ОП Тц, которые чаще встречались в виде скоплений периваскулярно и интрамиокардиально, что, вероятно, связано с их компенсаторной пролиферацией. На наш взгляд, значимое уменьшение ОП Тц и КМЦ, связано с их прогрессирующей гибелью при неблагоприятном течении ХСН, что приводит к формированию аномальной трехмерной пространственной организации и нарушению межклеточной сигнализации в миокарде. Снижение плотности Тц сопровождалось и значимым уменьшением ОП капилляров в миокарде, демонстрируя участие Тц в ангиогенезе.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОПТИМИЗАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Юрий Юрьевич Литвинов¹, Игорь Васильевич Матвейчук¹, Владимир Викторович Розанов^{1,2}

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва, Россия; ² Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

vilar.litvinov@mail.ru

При изготовлении имплантатов костная ткань остается предпочтительней другим материалам [2], отвечает известным требованиям для имплантации: способностью к биодеградации, замещению новообразованной костью, полной резорбцией, прорастанию кровеносных сосудов и костеобразованию, инертностью по отношению к окружающим тканям. Костный матрикс может служить адресной доставкой веществ, активирующих и усиливающих деление клеток, синтез внеклеточного вещества.

Цель исследования: совершенствование технологических приемов получения костных деминерализованных, деорганифицированных имплантатов и имплантационных препаратов с антимикробными свойствами.

Авторами предложена усовершенствованная технология получения костных имплантатов на основе стерильного деминерализованного и деорганифицированного костных матриксов с выраженными антимикробными свойствами за счет иммобилизации лекарственного средства (Сангвиритрин®), а также применен комплексный подход к анализу и оценке показателей качества получаемых костных имплантатов.

Методы физико-механической обработки кости с экспериментально установленными оптимальными параметрами режимов резания и охлаждения, анализа морфо-механических характеристик прим.мы ко всему циклу технологии получения костных биоимплантатов и, на их основе, имплантационных препаратов.

При получении деминерализованного и деорганифицированного костного матрикса апробирован современный метод элементного анализа костной ткани на разных этапах ее деминерализации и деорганификации с использованием энергодисперсионной

рентгеновской спектроскопии, что позволило контролировать степень удаления минеральной и органической фаз из костных имплантатов.

В работе использован инновационный «Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов» озono-кислородной смесью (первый этап) и радиационным облучением с пониженной дозой (10–15) кГр (второй этап). Использование только радиационной обработки потребовало бы более высоких доз — не менее (25–40) кГр.

Представленные данные являются базовыми для оптимизации технологии изготовления, хранения, стерилизации костных имплантатов, создания новых адсорбционных биоимплантологических лекарственных форм с антимикробными свойствами.

ВОЗМОЖНОСТИ КРИОГЕННОГО СТРУКТУРИРОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ В ПЛАНЕ СОЗДАНИЯ МАКРОПОРИСТЫХ МАТРИЦ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Владимир Иосифович Лозинский

Институт элементоорганических соединений им.А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

loz@ineos.ac.ru

Макропористые матрицы на основе биосовместимых нетоксичных полимеров природного происхождения имеют важное значение для клеточных технологий и тканевой инженерии, где такие материалы часто применяют в качестве носителей/подложек (англоязычный термин — scaffolds) при культивировании клеток или для формирования тканеинженерных конструкций. Одним из эффективных подходов к созданию подобных материалов является использование приемов криогенного структурирования полимерных систем, позволяющих получать биополимерные матрицы (так называемые *криоструктураты* и *криогели*) с развитой архитектурой сообщающихся крупных пор. Физико-химические свойства и макропористая морфология этих материалов, их стабильность в различных средах или, напротив, биodeградируемость, а также адгезивные характеристики в отношении различных типов клеток, определяются многими факторами. К ним относятся химическая природа биополимера, его содержание в подвергаемой криогенному структурированию системе, природа и концентрация сшивающих агентов (если таковые используются), режимы криогенной обработки и др. Именно особая макропористость в сочетании во многих случаях с хорошими механическими свойствами различных криогелей и криоструктуратов на основе биосовместимых полимеров делает указанные матрицы перспективными материалами биомедицинского назначения.

В лаборатории автора разработан, исследован и совместно со специалистами биомедицинского профиля успешно испытан (in vitro и in vivo) ряд новых дренажных и кровоостанавливающих покрытий на раны и ожоги, получены основанные на криогелях и криоструктуратах материалы для костной и хрящевой хирургии, серия гелевых систем контролируемого высвобождения лекарств, биodeградируемые носители депо-форм лекарственных средств, широкопористые подложки для объемного культивирования клеток (в том числе и стволовых) и др. Полученные результаты подтверждают широкие возможности методологии криоструктурирования в плане создания высокоэффективных макропористых

биополимерных матриц для клеточной/тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА И ПОЛИТЕТРАФТОРЭТИЛЕНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК

**Александр Петрович Лыков^{1,2},
Ольга Владимировна Повещенко^{1,2},
Мария Александровна Суворцева^{1,2},
Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2},
Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}**

¹ НИИКЭП-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

aplykov2@mail.ru

Аортокоронарное шунтирование является методом лечения ишемической болезни сердца. Недостатком сосудистых протезов, на основе политетрафторэтилена (ПТФЭ) или полиэтилентерефталата (ПЭТ), является возможность их окклюзии и отсутствие полного заселения внутренней поверхности эндотелиоцитами. Одним из способов повышения заселения сосудистых протезов клетками является их обработка адгезирующими веществами, в частности, фибронектином. Целью исследования стало сравнительное изучение влияния необработанных сосудистых протезов на функции костномозговых мезенхимных стволовых клеток (МСК), эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и клеток эндотелиальной линии (EA.hy 926) in vitro. МСК и ЭПК выделяли из костного мозга больных ишемической болезнью сердца, культивировали и наращивали по стандартной методике. EA.hy 926 любезно предоставлены Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Фенотипирование МСК и ЭПК осуществляли на проточном цитофлуориметре. Пролиферацию клеток в отсутствие и при наличии тестируемых сосудистых протезов осуществляли в MTT-тесте и по клеточному импедансу на xCELLigence System. Миграцию МСК и EA.hy 926 исследовали в тесте «заживления раны», а ЭПК в камере Бойдена. Миграцию клеток также исследовали на аппарате xCELLigence System. Эффект дзета-потенциала ПЭТ на заселение синтетического протеза без обработки и с модификацией его поверхности экспозицией с 10% желатина или 100 мкг/мл фибронектина. Кроме этого, оценивали уровни продукции клетками оксида азота (NO) с использованием реактива Грисса. Сосудистые синтетические протезы угнетают пролиферативную активность исследуемых клеток. В тесте «заживления раны» показано, что сосудистые протезы снижают миграцию МСК и EA.hy 926. Наличие сосудистых протезов стимулирует синтез МСК NO. Показано, что сосудистые протезы из ПЭТ подавляют пролиферацию и миграцию ЭПК по данным клеточного импеданса. Модификация поверхности сосудистого протеза из ПЭТ желатином или фибронектином усиливает адгезию и разрастание ЭПК на поверхности сосудистого протеза. Таким образом, политетрафторэтилен и полиэтилентерефталат обладают токсическим действием на эндотелиальные

и мезенхимные клетки, а модификация поверхности сосудистых протезов белками, способствует заселению поверхности протезов клетками.

ЛИЗАТ ТРОМБОЦИТОВ В ЛЕЧЕНИИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Александр Петрович Лыков^{1,2}, Мария Александровна Суровцева^{1,2}, Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2}, Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}, Ольга Михайловна Станишевская³, Дмитрий Валерьевич Черных³, Наталья Сергеевна Арбеньева³, Владимир Иванович Братко³, Александр Николаевич Трунов³, Валерий Вячеславович Черных³

¹ НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский филиал ФГАУ МНТК Микрохирургия глаза им. С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирск, Россия

aplykov2@mail.ru

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД), характеризуется дегенерацией пигментного эпителия сетчатки, мембраны Бруха и хориокапиллярного слоя. ВМД является одной из ведущих причин необратимой потери зрения и слепоты среди населения развитых стран мира в возрасте от 50 лет. Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами, показала высокий терапевтический потенциал в лечении воспалительно-дегенеративных заболеваний, в том числе роговицы глаз. Целью исследования стала оценка терапевтического потенциала лизата тромбоцитов (ЛТ) при идиопатической ВМД. Исследование проведено на 16 больных, у 8 больных проведена субтотальная трансконъюнктивальная витрэктомия с дополнительным лечением ЛТ (5 женщин и 3 мужчины), а у других 8 больных выполнена только субтотальная трансконъюнктивальная витрэктомия (5 женщин и 3 мужчины). ЛТ получали из венозной крови больных ВМД центрифугированием при 3800 оборотах в мин. у в течение 7 мин., далее собранную плазму повторно осаждали при 3500 оборотах в мин. у в течение 15 мин., переносят надосадочную плазму в стерильные пробирки, а осадок тромбоцитов в 1 мл плазмы подвергали 2-х кратной заморозке в жидком азоте (-196 °С) и разморозке при +37 °С, далее осуществляли фильтрацию через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, и смешивали с оставшейся частью плазмы. ЛТ заполняли дефект макулы в день выполнения субтотальной трансконъюнктивальной витрэктомии и в область крылонебной ямки 3–4 курса с интервалом 72–96 часов. Оценивали восстановление остроты зрения и закрытие макулярного разрыва через 7, 15, 30 и 90 суток. Дополнительное лечение ЛТ способствовало восстановлению остроты зрения как в раннем послеоперационном периоде (15 сутки), так и в отдаленном периоде (90 суток) по сравнению с группой больных, получившей только оперативное лечение ($p \leq 0,05$). Лечение ЛТ увеличивает частоту закрытия разрывов сетчатки глаза в макулярной области до 62,5%, тогда как только оперативное лечение приводит к закрытию дефекта сетчатки глаза в 37,5% случаев. Показано, что в ЛТ содержатся цитокины, ростовые факторы и оксид азота, которые вовлечены в процесс регенерации и (или) репарации сетчатки глаза.

ЭФФЕКТ ПЛАЗМЫ БОЛЬНЫХ ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, КЛЕТОК ВОВЛЕЧЕННЫХ В ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН

Александр Петрович Лыков^{1,2}, Мария Александровна Суровцева^{1,2}, Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2}, Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}, Евгения Викторовна Янкайте¹

¹ НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

aplykov2@mail.ru

Особенностью трофических язв нижних конечностей является склонность к рецидивам, увеличению площади поражения кожных покровов, низкая эффективность традиционных методов лечения, инвалидизация и смертность. Альтернативой традиционному лечению служит использование аутологичных биологически активных компонентов плазмы. Цель исследования изучение влияния лизата тромбоцитов (ЛТ) и обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) больных с трофическими язвами различного генеза на пролиферацию, миграцию, апоптоз и клеточный цикл дермальных фибробластов человека, мезенхимных стволовых клеток и клеток эндотелиальной линии EA.hy 926 in vitro. В исследование включено 7 больных с трофическими язвами на фоне сахарного диабета 2 типа, 7 больных с трофическими язвами венозной этиологии. Лизат тромбоцитов (ЛТ) и обедненную тромбоцитами плазму (ОТП) получали по стандартной методике. Дермальные фибробласты (ДФ), костномозговые мезенхимные стволовые клетки (МСК) получены от доноров, клетки эндотелиальной линии EA.hy 926, любезно предоставлены Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Исследовали пролиферацию всех типов клеток в МТТ-тесте, пролиферацию и миграцию ДФ в режиме реального времени на аппарате xCELLigence System по изменению клеточного импеданса. Клеточный цикл, апоптоз/некроз исследовали на проточном цитофлуориметре по стандартной методике. Показано, что ЛТ и ОТП больных трофическими язвами на фоне сахарного диабета 2 типа (СД2) угнетают пролиферацию ДФ, МСК и EA.hy 926 по данным МТТ-теста. Дополнительное исследование влияния ЛТ и ОТП на пролиферацию ДФ по параметру клеточного импеданса показало, что ОТП больных, особенно на фоне СД2 снижает пролиферативную активность ДФ, а ЛТ, особенно больных без СД2 активирует пролиферацию ДФ. ЛТ и ОТП стимулируют миграционную активность ДФ. ЛТ и ОТП больных трофическими язвами по-разному влияли на клеточный цикл и апоптоз/некроз исследуемых клеток. Таким образом, плазма больных с трофическими язвами на фоне сахарного диабета проявляет ингибирующее влияние на функциональную активность дермальных фибробластов человека.

ЭРИТРОПОЭТИН КАК СТИМУЛЯТОР ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Александр Петрович Лыков^{1,2}, Мария Александровна Суровцева^{1,2}, Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2}, Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}, Евгения Владимировна Янкайте¹

¹ НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

aplykov2@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) нашли свое применение в регенеративной медицине при воспалительно-дегенеративных процессах, включая дегенеративные процессы в межпозвонковых дисках и ишемию нижних конечностей. Эффективность терапии МСК во многом зависит от микроокружения, в которое они попадают, в том числе и от гипоксии в очаге поражения. Эритропоэтин помимо активации эритрона, оказывает антигипоксическое, анти-апоптотическое и ангиогенное действие.

Цель исследования — оценка терапевтического потенциала комбинации МСК с эритропоэтином при дегенерации межпозвонкового диска и критической ишемии нижних конечностей. Исследование проведено на крысах Wistar, которым пункцией межпозвонкового диска хвостового отдела индуцировали дегенеративно-воспалительный процесс, а перерезкой бедренной артерии, инициировали критическую ишемию. МСК получали из костного мозга крыс Wistar по стандартной методике, в работе использованы МСК 4-го пассажа. Лечение дегенеративного процесса в межпозвонковом диске начинали через 7 дней однократным введением МСК и МСК+эритропоэтин, эффективность лечения оценивали по данным МРТ и гистологии межпозвонкового диска на 14, 21 и 28 сутки от начала эксперимента. У крыс с экспериментальной моделью ишемии нижней конечности МСК и МСК+эритропоэтин вводили сразу после перерезки бедренной артерии в мышцы голени, эффективность лечения оценивали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии, уровням цитокинов в сыворотке крови и мышцах голени, гистологии мышц голени на 7, 14 и 28 сутки от начала эксперимента. Комбинация МСК с эритропоэтином способствовала более выраженному увеличению высоты межпозвонкового диска и активации репаративных процессов в пульпозном ядре. При критической ишемии нижних конечностей введение МСК и МСК+эритропоэтин способствовало увеличению микроциркуляции в стопе на стороне поражения, а также уменьшению выраженности некроза, истощения мышечных волокон и разрастания волокнистой соединительной ткани и увеличению количества сосудов, питающих мышцы. Уровни цитокинов в сыворотке крови и мышцах голени зависели от сроков исследования.

МОЛЕКУЛЯРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СФЕРОИДАХ

Ольга Геннадьевна Люблинская,
Николай Николаевич Никольский

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

o.lyublinskaya@mail.ru

Эффективность использования в регенеративной медицине мезенхимных стволовых и (или) прогениторных клеток человека доказана в многочисленных экспериментах на модельных животных, а также в клинических исследованиях (Wang et al., 2012). В последние годы опубликован ряд работ, свидетельствующих о высоком терапевтическом потенциале МСК, культивируемых в виде сфероидов (см. обзор Han et al., 2019), однако фундаментальные причины, которые обуславливают этот эффект, пока во многом не ясны. В Институте Цитологии РАН проведен цикл работ, посвященных изучению молекулярно-функционального профиля и терапевтического потенциала клеточных сфероидов, сформированных методом висячей капли из МСК эндометрия человека (эМСК). Установлено, что культивирование эМСК в виде сфероидов приводит к повышению экспрессии генов, отвечающих за стволовость клеток и продукцию противовоспалительных факторов, к усилению секреции ростовых факторов, к изменению характера ответа клеток на стресс. Показано, что эМСК, культивируемые в сфероидах, теряют способность отвечать на повреждающие воздействия активацией программы преждевременного старения, которая является характерной реакцией на стресс эМСК, культивируемых в стандартных условиях. В ответ на стресс клетки в сфероидах активируют программу апоптотической гибели, что приводит к элиминации из популяции клеток с поврежденным генетическим материалом и повышению трансплантационной безопасности эМСК с точки зрения клинических применений. Опыты на модельных животных (крысах) подтвердили, что трансплантация сфероидов оказывается более эффективным средством для коррекции как тканеспецифических патологий (дисфункций эндометрия), так и не-тканеспецифических повреждений (кожные раны), чем суспензии эМСК, культивируемых в геометрии монослоя. Проведенные исследования свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале эМСК-сфероидов, обусловленном изменением фенотипа и секреторного профиля клеток в условиях 3D культивирования, и доказывают перспективность применения сфероидов при наличии клинических показаний к использованию МСК в терапевтических целях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00108.

G-CSF УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ TGF- β В ТКАНИ ОПУХОЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС

Ирина Ляхова^{1,3}, Корнейко Мария¹, Зайцев Сергей¹, Брюховецкий Игорь^{1,2}, Хотимченко Юрий^{1,2}

¹ Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Россия;

² Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, Владивосток, Россия;

³ Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Владивосток, Россия

stud_nirs@mail.ru

Мультиформная глиобластома (МГБ) — одна из наиболее агрессивных опухолей головного мозга. На сегодняшний день прогноз для пациентов с МГБ не благоприятный, и медиана выживаемости составляет 15 месяцев. Химиотерапия темозоломидом сопровождается значительным снижением уровня лейкоцитов в периферической крови. В современных протоколах лечения лейкопении используются инъекции гематоэтических стволовых клеток или стимуляция красного костного мозга при помощи гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). Однако механизм действия данных манипуляций на опухолевую ткань до сих пор остается неизученным. Глиобластома инфильтрирована большим количеством иммунных клеток, включая клетки микроглии, макрофаги и миелоидные супрессорные клетки. Предыдущие исследования демонстрируют взаимосвязь между количеством макрофагов и клеток микроглии и степенью злокачественности глиом. Тем не менее, опухоль рекрутирует не только клетки мозга, но и циркулирующие в периферической крови гемопоэтические и прогениторные CD45⁺ клетки. Приоритетным путем их трансформации в ткань глиобластомы является дифференциация в направлении микроглии/макрофагов, продуцирующих TGF- β и другие цитокины. Целью настоящего исследования был анализ трансформации иммуноцитохимического профиля опухолевой ткани глиомы С6 у крыс под действием G-CSF, вводимого в течение 10 дней внутрибрюшинно. Было показано, что экспрессия микроглиального маркера IBA-1 в массе опухолевой ткани в несколько раз выше, чем его экспрессия на периферии опухоли. Применение G-CSF не вызывало увеличения числа IBA-1 позитивных клеток микроглии, которое наблюдается во время трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и неоднократно описывалось в литературе. Распределение M1 и M2 фенотипов микроглии также изучено путем определения уровня экспрессии маркеров CD 86 и CD 206. Активированные клетки M1 микроглии находились преимущественно в ткани, окружающей опухолевый узел, в отличие от активированной M2 микроглии, расположенной внутри очага опухоли. Исследование цитокинового профиля показало увеличение уровня TGF- β и снижение уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL 1 β . Механизмы этого явления требуют дальнейшего изучения, так как G-CSF активно используется в химиотерапии опухолей.

ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛАГЕНОВОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ТВЕРДОЙ МОЗГОВОЙ ОБОЛОЧКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Рони Бахаэддин Маи¹, Егор Олегович Осидак², Екатерина Сергеевна Мишина³, Владимир Евгеньевич Попов¹, Сергей Петрович Домогатский⁴

¹ Отделение детской хирургии, ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

² ООО фирмы «Имтек», МО г.Оболенск, Россия;

³ Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, ФГБОУ ВО Курский Государственный Медицинский Университет Минздрава России, Курск, Россия;

⁴ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

doctor.ronimai@gmail.com

Введение. Восстановление целостности твердой мозговой оболочки (ТМО) является приоритетным вопросом в сохранении гомеостаза при травматических и не травматических повреждениях. Вследствие достаточно агрессивной ликворной среды, находящейся в субдуральном пространстве, скорость регенерации на месте данного дефекта значительно снижена и закрытие обширных дефектов за счет собственных клеточных механизмов не представляется возможным. Поэтому задача о поиске оптимального решения этой проблемы является актуальной.

Цель. Оценить эффективность использования мембран изготовленных из нативного и ателоколлагена для пластики твердой мозговой оболочки.

Материалы и методы. Для изготовления коллагеновых мембран использовали нативный коллаген свиньи I типа (ViscollTM, PN2, ООО фирмы «Имтек») и ателоколлаген свиньи I типа (ViscollTM, PA2, ООО фирмы «Имтек»). Эксперимент был выполнен на 20 крысах-самцах линии Wistar. На всех животных применялась стандартная модель повреждения ТМО. Крысы были разделены на 2 экспериментальные группы. В группе I использовали мембраны, приготовленные из нативного коллагена во II группе — мембраны, приготовленные из ателоколлагена, контрольная группа — крысы с повреждением ТМО, без закрытия дефекта. Имплантация мембраны, после стандартного доступа к ТМО, проводилась аппликационным методом. Результаты эксперимента оценивали на 30, 60 и 90 сутки по данным биопсийного материала методами световой и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Отмечается разница при сопоставлении полученных результатов в разных группах. Замещение коллагеновой мембраны в группе I собственными тканями происходит равнонаправленно — дезинтеграция и прорастание соединительнотканью волокнами наблюдается от периферии к центру скаффолда. Клеточный компонент преимущественно представлен клетками фибробластического ряда. В группе II присутствующие кистозные составляющие, указывают на ассиметричное замещение. Контрольная группа характеризовалась очагами поверхностного некроза подлежащих тканей, рубцово-спаечным процессом, а также выраженной диффузной полиморфноклеточной инфильтрации.

Вывод. При использовании коллагеновых мембран наблюдалась полноценность регенеративного процесса, на месте дефекта ТМО, в агрессивной ликворной среде. При этом мембраны, изготовленные из нативного коллагена, в сравнении с мембранами, изготовленными из ателоколлагена, демонстрируют лучшую биосовместимость и сводят к минимуму риск развития рубцово-спаечного процесса.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАК ОРГАНИЗАТОРЫ ПРОЦЕССА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТКАНИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Павел Игоревич Макаревич^{1,2}, Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}, Елена Викторовна Парфёнова^{1,3}, Всеволод Арсеньевич Ткачук¹⁻³

¹ Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ Кардиологии Минздрава, Москва, Россия

Стромальные клетки, играя важную роль в поддержании тканевого гомеостаза и обновления клеточного состава органов, обладают потенциалом для выполнения рядом важных функций при репаративной регенерации. Наши данные, полученные на мультипотентных стромальных клетках (МСК) из различных источников, указывают на то, что им присуща координирующая, или организационная функция.

Устойчивость МСК к неблагоприятным условиям, характеризующим ранние этапы после повреждения, их присутствие во всех органах и тканях, а также высокая секреторная активность делают их практически оптимальным объектом для формирования ранних структур после повреждения ткани.

С другой стороны МСК обладают способностью дифференцироваться в миофибробласты — ключевые участники процесса фиброобразования ткани и формирования рубца — за счет чего они вносят свой вклад в процесс репарации с исходом в фиброз.

Тем не менее, МСК обладают тканеспецифичными характеристиками, за счет которых они могут оказывать различное влияние на процессы репарации и регенерации.

Все это позволили нам сформулировать роль МСК как клеток, координирующих ответ ткани на повреждение и оказывающих определяющее влияние на исход процесса ее восстановления. В ходе изучения этого процесса нами были установлены тканеспецифичные свойства МСК, выделенных из тканей, склонных к фиброобразованию (кожа, жировая ткань) и к регенерации (МСК эндометрия, или децидуальные клетки).

Используя сокультивирование МСК с клетками эндотелия, сборку тканеинженерных конструкций в виде пластов и РНК-секвенирование нами было показан ряд эффектов, отражающих роль МСК как «координаторов» формирования тканеподобных структур. Стромальные клетки оказались способны к самоорганизации и формированию гетерогенных конструкций, а также была дана их характеристика в плане стабилизации и поддержания клеток эндотелия.

Данная работа суммирует ряд собственных данных и предлагает взгляд на МСК как на тканеспецифичные организаторы, играющие важную роль как на ранних этапах восстановления ткани, так и при формировании более сложных структур с исходом в фиброз или полноценную регенерацию в зависимости от окружения и собственной «программы», определяемой генетическими и эпигенетическими факторами.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ при поддержке грантов РФФИ 17-04-01452 (получение и характеристика тканеинженерных конструкций) и 19-15-20053 (выделение и культура клеток),

а также гранта РФ № 19-75-00067 (характеристика тканеспецифичных свойств стромальных клеток в модели сокультивирования с эндотелием).

ЭФФЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ, НАСЫЩЕННЫХ ТРОМБОЦИТАМИ, ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЛУБОКИХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы, Москва, Россия

mcsimmc@yandex.ru

Актуальность. Тромбоциты в составе коллагеновых субстратов стимулируют пролиферативную и миграционную активность клеток человека *in vitro*. С другой стороны, избыток тромбоцитарных цитокинов способен ингибировать рост и дифференцировку диплоидных клеток, вызывает нарушение их структурной целостности.

Цель работы. Оценить клинические эффекты применения раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами, при лечении глубоких ран.

Материалы и методы. Исследование проводили на беспородных мышах. В работе использовали образцы децеллюляризованного дермального матрикса (ДМ) площадью 1 см². У мышей производили иссечение участка кожи до фасции диаметром 10 мм, для предотвращения контракции по краю раны подшивали полихлорвиниловое кольцо. В работе использовали ДМ без тромбоцитов (контроль); ДМ с нестабилизированными тромбоцитами (HeСтТр); ДМ с тромбоцитами, стабилизированными 2,5 мкМ наносеребра (СтТр). Общее количество тромбоцитов с гранулами в образцах ДМ составило 28 млн. Вывод мышей из эксперимента проводили на 3, 14 и 21 сутки. Клинический эффект оценивали по выраженности воспаления, миграции клеток, формированию грануляций, эпителизации.

Результаты. Через 3 суток у всех животных наблюдалась выраженная гиперемия и отечность раны и подлежащих тканей с высоким уровнем инфильтрации клетками воспаления. У 4 животных из 5 в группе лечения ДМ с HeСтТр в подлежащих слоях раны выявлена интенсивная миграция макрофагов и фибробластов. В группе лечения ДМ со СтТр миграция фибробластов наблюдалась у 3 животных из 5, но была менее выраженной. В контроле активной миграции фибробластов в рану не выявлено. Через 14 суток в контроле и в эксперименте по всему дну раны формировалась грануляционная ткань. В контроле количество сосудов на 1 мм² составило 171±33, в группе лечения ДМ с HeСтТр — 704±67, в группе лечения ДМ со СтТр — 317±77. В обеих опытных группах наблюдался интенсивный рост краевого эпителия, при этом сохранялась инфильтрация дна раны клетками воспаления, более выраженная в группе ДМ с СтТр. На 21 сутки у большинства животных опытных групп раны эпителизовались, тогда как в контрольной группе сохранялся поверхностный дефект до 20–30% от исходной раны. Гистологическая картина во всех группах соответствовала этапу ремоделирования.

Выводы. Использование раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами, при лечении глубоких ран

стимулирует процесс регенерации. В то же время при заданной дозе тромбоцитов стабилизация наносеребром не повышала репаративную эффективность раневого покрытия.

СОДЕРЖАНИЕ РЕПАРАТИВНЫХ ФАКТОРОВ В БЕДНОЙ И БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЕ

Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы, Москва, Россия

mcsimmc@yandex.ru

Цель. Оценить уровень репаративных факторов в плазме, полученной в процессе заготовки тромбоцитов для местного применения.

Материалы и методы. В работе использовали консервированную венозную кровь 8 доноров-добровольцев. Из каждого образца крови получали богатую тромбоцитами плазму (БоТП, $\text{Plt} = 1595,4 \pm 76,8 \times 10^9/\text{л}$, $\text{WBC} = 1,7 \pm 0,64 \times 10^9/\text{л}$); плазму, бедную тромбоцитами (БедПл, $\text{Plt} = 80,4 \pm 4,5 \times 10^9/\text{л}$, $\text{WBC} = 0$); БоТП с высоким содержанием лейкоцитов ($\text{Plt} = 1777,0 \pm 73,9 \times 10^9/\text{л}$, $\text{WBC} = 18,1 \pm 3,6 \times 10^9/\text{л}$). Лизаты клеток получали путем криодеструкции и исследовали с помощью мультиплексного анализа на платформе Luminex 200. Определяли концентрацию тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов (FGF), эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста (TGF- α), фактора некроза опухолей (TNF- α), интерлейкина 8 (IL8), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в пг/мл. Для статистической обработки вычисляли медиану (M), квартили (25%;75%), коэффициент корреляции Спирмена (r). Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Результаты. В лизате БоТП концентрация PDGF составила 1064 [912; 2465], FGF — 298 [156; 626], EGF — 913 [811; 1029], TGF- α — 2,0 [1,0; 2,9], VEGF — 216 [145; 357], TNF- α — 25 [20; 42], IL8 — 12,3 [7,1; 27,2] пг/мл. В БедПл по сравнению с БоТП уровень PDGF и EGF был снижен в 8–9 раз, уровень TNF- α и TGF- α — в 1,5 раза ($p < 0,05$). Напротив, содержание VEGF в БедПл было в 1,3 раза выше, чем БоТП ($p < 0,05$). Содержание IL8 и FGF в БоТП и БедПл достоверно не различалось. В образцах БоТП с высоким содержанием лейкоцитов отмечено увеличение концентрации PDGF (в 2 раза) и IL8 (в 5,6 раз) по сравнению с исходной БоТП, концентрации других факторов значимо не различались. В процессе исследования лизатов выявлена сильная корреляционная зависимость между уровнем PDGF и EGF ($r = 0,73$), VEGF и TNF- α ($r = 0,75$), TGF- α и TNF- α ($r = 0,76$). Можно предположить, что эти факторы являются ко-локализованными, т.е. содержатся в одних и тех же гранулах тромбоцитов. Общая концентрация тромбоцитов в БоТП коррелировала только с уровнем EGF ($r = 0,62$).

Выводы. Ростовые факторы могут быть получены как в составе БоТП, так и в составе БедПл. Присутствие лейкоцитов достоверно повышает уровень PDGF и IL8 в лизате БоТП. Существует взаимосвязь между концентрацией тромбоцитарных факторов в тромбоцитах, независимо от общего содержания тромбоцитов в плазме. Полученные данные следует учитывать при выборе подхода к использованию тромбоцитов в регенеративной медицине.

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА СНИЖАЮТ СЕКРЕЦИЮ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В АДГЕЗИРУЮЩИХ ТРОМБОЦИТАХ

Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы, Москва, Россия

mcsimmc@yandex.ru

Цель. Оценить сохранность ростовых факторов в адгезирующих тромбоцитах в присутствии наночастиц серебра.

Материалы и методы. В работе использовали богатую тромбоцитами плазму (БоТП), выделенную из крови доноров-добровольцев. Образцы БоТП аликвотировали в 4 пластиковые пробирки по 500 мкл, в 3 из них добавляли наносеребро в концентрации 1,25, 2,5 и 5 мкМ соответственно для стабилизации тромбоцитарных гранул (опытные образцы), четвертую оставляли без наночастиц в качестве контроля. Контрольные и опытные образцы БоТП наносили на коллагеновые повязки и инкубировали в течение 30 мин. при 37 °С для стимуляции массовой адгезии тромбоцитов. Затем из контрольных и опытных образцов отбирали жидкую фракцию и центрифугировали ее при 3000 г для удаления клеточных фрагментов. В полученном надосадке определяли содержание фактора роста эндотелия сосудов VEGF, эпидермального фактора роста EGF, трансформирующего фактора роста TGF- α , тромбоцитарного фактора роста PDGF в пг/мл с помощью мультиплексного анализа на платформе Luminex 200. Сохранность ростовых факторов в коллагеновых повязках оценивали по степени снижения их концентрации (в %) в опытных и контрольных образцах по сравнению с исходной БоТП. Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия значеный считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В лизате исходной БоТП уровень VEGF составил в среднем 1242, EGF — 292, TGF- α — 14, PDGF — 1263 пг/мл. После адгезии тромбоцитов на коллагеновых повязках содержание данных факторов в надосадке контрольных образцов значимо не отличалось от исходных значений ($p > 0,05$). Таким образом, в отсутствие наносеребра адгезирующие тромбоциты выделяли в плазму весь объем содержащихся в них ростовых факторов. В опытных образцах сохранность факторов в тромбоцитах была неодинаковой при разных дозах наносеребра. По сравнению с исходными значениями в надосадке БоТП концентрации EGF и VEGF были снижены при 1,25 мкМ наносеребра на 43% и 61%, при 2,5 мкМ — на 30 и 54%, соответственно ($p < 0,05$). Наибольшее снижение концентраций PDGF и TGF- α отмечено при 2,5 мкМ наносеребра, составляя соответственно 40 и 74% ($p < 0,05$).

Выводы. Наночастицы серебра позволяют сохранить ростовые факторы в составе адгезирующих тромбоцитов. Для стабилизации EGF и VEGF наиболее эффективна концентрация наносеребра 1,25 мкМ, для стабилизации PDGF и TGF- α — 2,5 мкМ. Стабилизация тромбоцитов с помощью наносеребра может быть использована при создании тромбоцит-насыщенных трансплантатов.

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНОГО С МИАСТЕНИЕЙ ПОСЛЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ И АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК (ВИСТ АТ). КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Сергей Владимирович Макаров

АНО Институт регенеративной медицины, Москва, Россия

iimmsv@yandex.ru

В настоящее время происходит дальнейшее исследование технологий, связанных с регенеративной медициной и поиск ниши их применения в лечении аутоиммунных заболеваний, в том числе миастении. Клиническое исследование проводилось в рамках целевой территориальной программы (1999–2012 гг.) по использованию методов трансплантации и клеточных технологий. Применялся стандартный протокол ведения больных EBMT (Швейцария, Базель).

Пациент Е., 1964 г.р. Клинический диагноз: Миастения. Генерализованная форма с бульбарным синдромом в фазе субкомпенсации. Болен с 20 лет, когда стал отмечать опущение левого века, затруднение глотания (бульбарный синдром), общую слабость со снижением силы мышц до 3,0–4,0 баллов. Позже эпизодически присоединялось затруднение дыхания, глазодвигательные нарушения. В 1985 году произведена тимэктомия со значительным регрессом клинических симптомов, затем находился на поддерживающей терапии антихолинэстеразными препаратами. С 1999 года состояние вновь ухудшилось, вырос бульбарный синдром, появились миастенические кризы. Назначена иммуносупрессивная терапия, которая дала временный клинический эффект. В 2001 году после очередных кризов проведена ВИСТ АТ. В раннем посттрансплантационном периоде наблюдался регресс бульбарного синдрома, признаков периферического тетрапареза с восстановлением силы мышц до 4,0–5,0 баллов. Сохранялся незначительный птоз. Принимал небольшие дозы калимина. За несколько месяцев полностью восстановилась сила мышц. В течение 10-летнего периода наблюдения нарастания неврологической симптоматики не отмечалось, эпизодически принимал небольшие дозы антихолинэстеразных препаратов. Таким образом, достигнутый стойкий клинический результат после ВИСТ АТ сохранялся в течение всего периода наблюдения. Иммунологические вопросы ВИСТ АТ до конца не изучены. Отмечается нивелирование аутоиммунных механизмов, что приводит к длительной ремиссии, иногда наблюдается феномен «постоянной ремиссии». Во многом это связано с эрадикацией аутореактивных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, инициирующих выработку антител. В обновленной иммунной системе сохраняются достигнутые сано-генетические механизмы. Тем не менее, ВИСТ АТ имеет ряд побочных эффектов, что ограничивает ее применение. Технология трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при аутоиммунных заболеваниях нуждается в дальнейшем изучении для практического использования.

ПЕРСПЕКИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК), ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Олег Германович Макеев¹, Артем Владимирович Коротков¹, Ольга Алексеевна Сатонкина²

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

² ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

larim@mail.ru

Прогрессирующая печеночная недостаточность является патологией, для терапии которой пересадка органа остается практически безальтернативным методом. Не смотря на очевидные успехи трансплантологии, эффективность пересадки печени остается невысокой. С учетом изложенного, целью данного исследования явилось изучение возможности коррекции цирротических изменений в печени путем введения ММСК после трансфекционирования их эпизомным вектором, содержащим фактор роста гепатоцитов (HGF).

На экспериментальной модели хронического фиброзирующего повреждения печени (крысы-самцы породы Вистар (n=120), затравка CCl₄, длительность эксперимента 90 суток) изучена эффективность клеточной и генно-клеточной терапии при коррекции хронической печеночной недостаточности. Выполнено 3 группы опытов: I группа (n=30) — контрольная (введение физиологического раствора); II группа (n=30) — введение в печень суспензии донорских мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в количестве 8×10⁶ клеток; III группа (n=30) — введение в печень трансфекционированных путем трансфекции плазмидой, содержащей ген фактора роста гепатоцитов, донорских мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в суммарной дозе 8×10⁶ клеток; IV группа (n=30) — введение животным плазмиды, содержащей в качестве полезного гена ген фактора роста гепатоцитов в дозе 0,03 мг по ДНК. Установлено, что клеточная терапия во II и III группах способствовала достоверно ускоренной нормализации нарушенных функций печени: к 40-м (II группа) и 20 (III группа) суткам вместо 90 суток в контроле (I группа). Гистологический анализ показал, что через 90 суток темп дефиброзирования ткани печени в III группе был существенно более выражен, чем во II группе. Полученный эффект можно объяснить тем, что разработанные клеточно-инженерные конструкции обеспечивают адекватные условия для пролонгированной жизнедеятельности трансплантированных клеток. Показатели IV группы животных практически не отличались от таковых, зарегистрированных в контрольной группе.

ДОЛГОСРОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МАЛЫХ ДОЗ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ЯЗВ

Надежда Викторовна Максимова¹, Михаил Евгеньевич Крашенинников¹, Игорь Анатольевич Помыткин¹, Илья Дмитриевич Клабуков¹, Анна Валентиновна Миченко², Галина Афанасьевна Мельниченко³, Алексей Валерьевич Люндуп¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

lyundup@gmail.com

Цель. Оценить эффективность использования аутологичных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК) в лечении язв диабетической стопы.

Материалы. В 2015 году клеточную терапию получили 3 пациента с сахарным диабетом 2-го типа и незаживающими более 3 мес нейропатическими язвами (стадии 2А, площадью 4,2, 42, 20,4 см², соответственно) с динамикой эпителизации менее 30% за 14 дней. Стандартная терапия включала применение суспензии ММСК в дозе 4×10⁴ кл./см² [1]. Затем 3 года спустя была проведена дерматоскопия (Heine DELTA 20) и ультразвуковое исследование (DUB SkinScanner, 22MHz) для оценки долгосрочных результатов в зонах заживления язв и контрольных зонах на контралатеральных стопах.

Результаты. Диабетические язвы эпителизировались на сроках 18, 154, 98 сут, соответственно. В течение трех лет у всех пациентов не было выявлено рецидивов в области заживления первичной язвы. По данным дерматоскопии, у всех пациентов в зонах заживления выявлены рубцовые ткани с пигментированным пурпурным дерматозом. Результаты ультразвукового исследования зон заживления язвенных поражений показали изменения, соответствующие образованию гипертрофированных рубцовых тканей и признакам их васкуляризации. Признаков келоидного характера рубцовых изменений выявлено не было.

Выводы. Результаты подтверждают эффективность локального применения малых доз аутологичных ММСК при лечении язв диабетической стопы и определяют необходимость дальнейших сравнительных клинических исследований.

Литература:

1. Maksimova N., Krasheninnikov M., Zhang Y. et al. Early passage autologous mesenchymal stromal cells accelerate diabetic wound re-epithelialization: A clinical case study. *Cytotherapy* 2017; 19(12): 1548–50.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ АУТОЛОГИЧНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У МУЖЧИН

Серафима Юрьевна Максимова, Анушаван Оганесович Папоян, Ксения Владимировна Данилко, Тимур Ильдусович Биккузин, Амир Рафисович Фарганов, Валентин Николаевич Павлов

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

maksimova-serafima@mail.ru

Стрессовое недержание мочи встречается у 9–16% мужчин, перенесших радикальную простатэктомию. В основе патогенеза лежит интраоперационное повреждение сфинктера мочевого пузыря, а также окружающих нервов и поддерживающей соединительной ткани. Лечение недержания мочи может быть консервативным, включая медикаментозную терапию, поведенческую терапию, физиотерапию, упражнения мышц тазового дна. Хирургические методы лечения, такие как инъекции объем-образующих веществ в область сфинктера мочевого пузыря, являются более эффективными. Однако, последние не обладают достаточно долгосрочным клиническим эффектом.

В проведенных исследованиях продемонстрирована эффективность стромально-васкулярной фракции (СВФ), как источника клеточного материала для регенеративной медицины, ввиду содержания различных популяций стволовых клеток. Также показана перспективная долгосрочная эффективность.

Нами предложена методика парауретрального введения СВФ в область сфинктера мочевого пузыря мужчинам с симптомами стрессового недержания мочи 1–2 степени после радикальной простатэктомии. Исследование показало, что применение СВФ является безопасным вариантом лечения стрессового недержания мочи. Эффективность метода оценивалась по результатам Pad-теста, ISIQ-SF и QoL, и составила 50%. В группе с положительным эффектом значение Pad-теста уменьшилось в среднем с 2–3 до 0–1, балл по опроснику ISIQ-SF с 7–11 до 1–4 и оценка по опроснику QoL с 4–6 до 1–2. Дальнейшие исследования позволят разработать новые терапевтические стратегии с определением оптимальной дозы, количества и локализации инъекций, необходимых для повышения его долгосрочной эффективности.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНОГО ФЕНОТИПА ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Туяна Баировна Маланханова¹⁻⁴, Елена Викторовна Григорьева¹⁻⁴, Любовь Александровна Сульдина¹, Ксения Николаевна Морозова¹, Елена Владимировна Киселева¹, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴, Анастасия Александровна Малахова¹⁻⁴

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия;

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия;

⁴ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

tbmalkanhanova@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) — это нейродегенеративное заболевание, вызванное увеличением числа повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*, который кодирует белок хантингтин. Вследствие такого нарушения мутантный хантингтин содержит удлиненный полиглутаминовый тракт, из-за чего белок приобретает неправильную конформацию, не выполняет свои функции и оказывает токсический эффект на срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума. Потеря СШН приводит к двигательным дисфункциям, когнитивным расстройствам и, в конечном счете, смерти пациента.

Для изучения молекулярных аспектов развития БХ необходимы модельные системы, которые наиболее точно воспроизводят фенотип заболевания. Такими моделями могут быть изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, которые обеспечивают адекватный «отрицательный» контроль, поскольку имеют идентичный генетический фон и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием мутации, вызывающей конкретное заболевание. Изогенные клеточные модели являются также перспективной платформой для тестирования лекарственных препаратов.

В данной работе получена клеточная система, моделирующая болезнь Хантингтона, на основе изогенных линий ИПСК. Мутация была внесена с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации. Подтвержден плюрипотентный статус полученных клеточных линий с помощью ряда стандартных тестов. Было показано, что у ИПСК с мутацией в гене *HTT* нарушена способность формирования нейтральных розеток при спонтанной нейральной дифференцировке. По протоколу, разработанному в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, проведена направленная дифференцировка полученных клеточных линий, изогенного контроля и положительного контроля — линия пациент-специфичных ИПСК с 47/17 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT*, в СШН стриатума. С помощью электронномикроскопического анализа были выявлены ультраструктурные аномалии в мутантных нейронах. Кроме того, было показано, что предшественники мутантных СШН имеют более низкий уровень N-кадгерина и повышенную чувствительность к удалению ростового фактора BDNF по сравнению с изогенным здоровым контролем. Таким образом, данная клеточная модель воспроизводит

патологический фенотип *in vitro* и может служить релевантной системой для исследований БХ.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-10128П.

NOTCH-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

Анна Борисовна Малашичева¹⁻³, Александра Станиславовна Костина^{1,2}, Дарья Сергеевна Семенова¹⁻³

¹ Лаборатория регенеративной биомедицины, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Лаборатория молекулярной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

³ Биологический факультет СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

amalashicheva@gmail.com

Остеогенная дифференцировка — многоступенчатый процесс, этапы которого протекают сходно при образовании костной ткани в норме и при кальцификации сосудов и клапанов сердца при патологии и старении. Гены и соответствующие белки, которые накапливаются на продвинутых стадиях остеогенной дифференцировки, относятся к семействам WNT, BMP и RUNX. Факторы активации генов и клеточных сигнальных путей на ранних этапах остеогенной дифференцировки как в норме, так и при патологической кальцификации остаются слабо изученными. Расшифровка ранних механизмов запуска остеогенной дифференцировки важна с точки зрения возможности управления этой дифференцировкой — для индукции остеогенеза, когда необходимо образование костной ткани, либо для предотвращения при различных патологиях, связанных с кальцификацией тканей. Целью нашей работы является поиск ранних инициаторных механизмов остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, приводящих к патологической кальцификации тканей сердца. В работе использован спектр клеток мезенхимного происхождения: мезенхимные клетки жировой ткани человека, мезенхимные клетки сердца человека и крысы, интерстициальные клетки аортального клапана, гладкомышечные клетки аорты. Исследована роль сигнального пути Notch в активации остеогенных путей дифференцировки клеток и соответствующих генов. Сделаны выводы о роли компонентов сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке.

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-29-04082.

ДОКОЗАГЕКСАЕНОВАЯ КИСЛОТА МОДУЛИРУЕТ МИКРОГЛИАЛЬНУЮ/МАКРОФАГАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

Ольга Сергеевна Манжуло, Инесса Валерьевна Дюйзен, Игорь Викторович Манжуло

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

olga.manzhulo@bk.ru

Травма спинного мозга (ТСМ) стоит на третьем месте в мире по числу инвалидизации населения в наиболее трудоспособном возрасте, что определяет высокую социальную значимость данной патологии. Медицинский

аспект актуальности данной проблемы определяется весьма ограниченным числом препаратов, способных оказывать лечебное воздействие в острый посттравматический период и на этапах реабилитации.

В нашем исследовании использовали модель компрессионной травмы спинного мозга крыс. Двигательная активность животных после ТСМ оценивалась с помощью шкалы BBB. Для характеристики воспалительного процесса в области повреждения спинного мозга, проведено картирование общего пула микроглии/макрофагов (iba-1), провоспалительного M1-типа (CD86) и противовоспалительного M2-типа (CD163) микроглии/макрофагов на 7 и 35 дней после операции.

Подкожное введение докозагексаеновой кислоты (ДГК, 45 мг/кг) приводит к более успешному восстановлению двигательной активности крыс после ТСМ. На 7 день после операции между экспериментальными группами не наблюдалось различий в площади окрашивания CD86-позитивной микроглии/макрофагов, однако в более поздний период восстановительного процесса (35 день), ДГК значительно снижает активность провоспалительной микроглии/макрофагов. В тоже время, ДГК приводит к увеличению площади окрашивания CD163-позитивной микроглии/макрофагов на 7 и 35 день после ТСМ, что свидетельствует об усилении активности противовоспалительного M2-типа микроглии/макрофагов. Регуляция активности M1/M2-типа микроглии/макрофагов вероятно является решающим фактором в процессе восстановления нервных волокон и двигательной активности животных с ТСМ при введении ДГК.

Ранее в экспериментах *in vitro* показано, что ДГК ингибирует экспрессию маркеров M1-микроглии/макрофагов (CD68, CD40), уменьшает выработку провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) и стимулирует экспрессию M2-микроглии/макрофагов (CD206). Точные механизмы регуляции активности микроглии/макрофагов в динамике развития различных патофизиологических процессов на сегодняшний день неизвестны. В целом, результаты проведенного исследования демонстрируют, что ДГК обладает комплексным действием на течение посттравматического процесса в центральной нервной системе, что свидетельствует о ее высоком терапевтическом потенциале.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 17-74-20006.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ КАЛИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ирина Ильинична Марахова, Алиса Павловна Домнина, Наталья Алексеевна Пуговкина, Алла Николаевна Шатрова, Николай Николаевич Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

imarakhova@mail.ru

Изменения трансмембранных ионных потоков и связанные с ними изменения внутриклеточного содержания катионов, мембранного потенциала и содержания в клетках воды играют важную роль в реализации иницируемой внешними сигналами геномной программы клетки и формировании специфического клеточного ответа. Общеизвестно, что моновалентные ионы (натрий, хлор, водород) вовлечены в процессы регуляции клеточного цикла, являясь элементами системы внутриклеточной сигнализации. Калий — доминирующий

катион в цитоплазме большинства животных клеток и в клеточном ответе на внешний сигнал не может выполнять сигнальную функцию.

В работе устанавливается связь между внутриклеточным содержанием калия и пролиферацией стволовых клеток в культуре. Выявлены изменения внутриклеточного содержания калия, сопровождающие рост культуры мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека: внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок (K_b/g) снижается с 1,1–1,0 до 0,7–0,6 ммоль/г с увеличением плотности культуры и возрастом клеточной линии. Обнаружено, что в МСК, культивируемых в сфероиде, K_b/g снижено, но отношение содержания калия к содержанию натрия остается высоким, а при переходе от культивирования клеток в сфероиде к монослою K_b/g возрастает. Связанное с плотностью, возрастом и условиями культивирования снижение K_b/g коррелирует со снижением пролиферативной активности культуры МСК и задержкой клеток в G1 фазе клеточного цикла. Анализ данных об изменениях K_b/g и внутриклеточного содержания воды при запуске или торможении клеточной пролиферации на основании теории водно-осмотического баланса клеток животных показал, что при выходе клеток из покоящегося состояния в клеточный цикл внутриклеточная концентрация калия остается неизменной, но калий, являясь главным внутриклеточным проникающим катионом, участвует в регуляции клеточного объема и содержания воды в клетке. Сделан вывод, что высокое внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок как показатель высокой гидратации клетки является функциональным маркером пролиферации и трансформации клеток.

Работа поддержана Программой научных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

3D ПРИНТИНГ ГИАЛУРОНОВЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Александра Олеговна Марьянац¹, Роман Александрович Акасов², Антон Владимирович Миронов¹, Анастасия Владимировна Сочилина^{1,2}, Александр Георгиевич Савельев¹, Евгений Валерьевич Хайдуков¹, Владимир Карпович Попов¹

¹ ИТФ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

amariyanac@mail.ru

Тканеинженерные конструкции (ТИК) используются в регенеративной медицине для замещения участков тканей и органов, утраченных вследствие травм и иных причин. Необходимыми характеристиками искусственного полимерного матрикса, составляющего основу ТИК, являются биосовместимость и биорезорбируемость. Имплантированные в организм матриксы, постепенно резорбируясь, в идеале, должны замещаться естественной тканью. Одним из наиболее перспективных материалов для создания биосовместимых матриксов является гиалуроновая кислота, представляющая собой активный компонент внеклеточного матрикса, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, а также играющий значительную роль в пролиферации клеток.

В настоящей работе исследована возможность формирования объемных матриц заданной архитектуры, на основе модифицированной гиалуроновой кислоты, способной к фотоотверждению. На экспериментальной установке методом экструзионной трехмерной (3D) печати изготовлены матрицы в виде трехмерной сетки размером $3 \times 3 \text{ мм}^2$. Фотоотверждение полимерной композиции выполнялось путем ее экспонирования на длине волны 450 нм. С использованием культур иммортализованных фибробластов человека Bj-5ta исследованы матричные свойства (цитотоксичность и цитосовместимость) полученных структур. Оценка роста клеток на поверхности матриц проводилась с помощью световой микроскопии, пролиферативного теста WST-1 (на 7 и 14 день) и флуоресцентного окрашивания Кальцеином АМ (на 7 и 14 день).

Фибробласты прикреплялись к поверхности матриц в течение 24 часов с их последующим ростом и пролиферацией в течение двух недель. В основном, клетки прикреплялись в областях пересечения волокон сетчатой структуры, где поверхность была наиболее шероховатой. Показано отсутствие цитотоксичности исследованных матриц. Жизнеспособность прикрепившихся клеток подтверждена результатами конфокальной микроскопии.

Таким образом, показано, что изготовленные методом экструзионной (3D) печати матрицы на основе модифицированной гиалуроновой кислоты обеспечивают эффективную адгезию и пролиферацию клеток, и могут быть использованы в качестве основы различных ТИК.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части разработки установки трехмерной печати, РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-01055 мк в части разработки полимерной композиции и № 19-33-90285 Аспиранты в части клеточных испытаний.

РЕАКЦИЯ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ГРЫЗУНОВ НА ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И МОДЕЛИРОВАНИЯ ИХ ЭФФЕКТОВ

Елена Александровна Маркина, Ирина Вячеславовна Андрианова, Елена Викторовна Сотнезова, Людмила Борисовна Буравкова

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем, Москва, Россия

goncharova-tim@list.ru

В настоящее время основной задачей биологических экспериментов в космических полетах (КП) и при наземном моделировании является изучение фундаментальных механизмов адаптации к воздействию комплекса факторов (главным образом, микрогравитации и радиационного облучения). Наиболее остро во время КП реагируют опорно-двигательная и кровеносная системы.

Цель работы: сравнить влияние 30-суточного КП и наземного моделирования некоторых эффектов микрогравитации и γ -излучения на прогениторные клетки костного мозга (КМ) грызунов.

Исследование проводили на мышах C57Bl/6N после полета на биоспутнике «Бион-М1» и антиортостатического вывешивания, а также крысах Wistar после антиортостатического вывешивания и γ -облучения.

Определяли количество, иммунофенотип, пролиферативную активность клеток КМ, число

и дифференцировочный потенциал гемопоэтических и стромальных колониобразующих единиц (КОЕ).

КП не влиял на клеточность, пролиферативную и дифференцировочную активность и число КОЕ-ф КМ мышей. Соотношение $CD45^+/CD90^+$ увеличивалось. Число гемопоэтических КОЕ не менялось, а БОЕ-Э снижалось в 6 раз по сравнению с наземным контролем.

После вывешивания в КМ мышей снижалась клеточность, $CD45^+/CD90^+$ увеличивалось, клеточный прирост снизился в 2 раза. Уменьшалось число гемопоэтических КОЕ, за счет БОЕ-Э. КОЕ-ф уменьшилось в 1,5 раза. Угнеталась остеодифференцировка.

При моделировании эффектов КП у крыс не изменились клеточность, пролиферативная активность и остеопотенциал клеток КМ, число КОЕ-ф снижалось. Облучение привело к усилению адиподифференцировки, снижению числа гемопоэтических КОЕ. При вывешивании увеличивалось $CD45^+/CD90^+$. Количество БОЕ-Э после вывешивания уменьшалось, облучения — увеличивалось.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что факторы длительного КП не повлияли на клеточность, клоногенную и пролиферативную активность, спонтанный дифференцировочный остео- и адипопотенциал стромальных предшественников КМ мышей. При моделировании эффектов КП негативные эффекты в стромальных предшественниках КМ более выражены. Увеличение соотношения $CD45^+/CD90^+$ выявлено как после КП, так и после вывешивания. Факторы длительного КП, как и моделирование микрогравитации оказывают негативное влияние на эритропоэз.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ ИМБП РАН № 65.3 и гранта РФФИ 19-015-00206

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГОМЕОБОКС-СОДЕРЖАЩИХ ГЕНОВ И ИХ ИЗОФОРМ КАК ОСНОВА РАЗЛИЧИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ОТВЕТОВ

Юлия Владимировна Маркитантова, Владимир Николаевич Симицкий
ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

yuliya.mark@gmail.com

В свете современных представлений регенерация тканей и органов хвостатых амфибий осуществляется под координированным контролем, объединяющим генный, эпигенетический, локальный и системный уровни регуляции. Ведущую роль в работе генных сетей, контролирующих процессы регенерации, играют гомеобоксодержащие гены. Уникальным примером полноценной регенерации после повреждения или удаления ткани служит сетчатка хвостатых амфибий, в отличие от таковой у высших позвоночных, регенерационные способности у которых ограничены. В процессе регенерации сетчатки из клеток РПЭ у взрослых тритонов происходит реактивация целого ряда гомеобоксодержащих генов, контролирующих дифференцировку специализированных типов клеток сетчатки в эмбриогенезе. Использование технологий высокоэффективного секвенирования (NGS) способствовало появлению массива данных по транскриптому нативной и регенерирующей сетчатки и геному хвостатых амфибий (Eleva et al., 2017; Nakamura et al., 2014; Abdullayev et al., 2013). Для поиска полноразмерных транскриптов в базе данных транскриптома туловища тритонов *P. waltl* (Eleva

et al., 2017) и генома аксолотля (Nowoshilow et al., 2018) проведен биоинформационный анализ для ряда гомеобоксодержащих генов семейств Pax и Pitx у хвостатых амфибий. Данные свидетельствуют о видовых различиях структурно-функциональной организации этих групп генов и их изоформ, и о специфичности их экспрессии (видовой и тканевой). Становится очевидным, что при сходстве некоторых звеньев клеточных и молекулярных процессов, действие которых направлено на защиту клетки от стресса, существуют также эволюционно закрепленные функциональные различия стратегий клеточных процессов и морфогенеза у отдаленных видов позвоночных, которые основаны на генетических программах регуляции дифференцировки клеток сетчатки на уровне транскриптома, генома, эпигенома и метаболома. Все это определяет выбор стратегий регенерации: активация эндогенных стволовых и (или) прогениторных клеток и (или) репрограммирование дифференцированных клеток (пигментный эпителий сетчатки, глия Мюллера). Сравнительный биоинформационный анализ регуляторных факторов и сигнальных путей, через которые реализуются регенерационные ответы при повреждении и патологии нейральных тканей глаза, позволяет оценить возможности восстановления ткани и выбрать оптимальные стратегии клеточной и/или генной терапии для активации регенерационного потенциала нейральной ткани глаза у высших позвоночных.

Работа выполнена в рамках темы НИР № ИНГЗ 0108-2019-0005.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СДВИГОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ

Ваге Аршалуйсович Маркосян¹, Михаил Евгеньевич Соколов¹, Евгений Сергеевич Ким¹, Дмитрий Александрович Трофимов¹, Айрат Мансурович Гибадуллин¹, Грайр Грайрович Кундакчян², Андрей Александрович Измайлов¹, Максим Сергеевич Кузнецов¹, Равиль Расимович Гарифуллин¹, Артем Анатольевич Суриков¹, Регина Ринатовна Миннигалева¹

¹ ФГБОУ ВО Казанский Государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Россия;

² ИФМиБ, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Минобрнауки России, Казань, Россия

vage.markosyan@gmail.com

Несмотря на повышение эффективности современной терапии ишемического инсульта головного мозга, выздоровление пациентов не происходит в достаточной мере. В доклинических испытаниях новых способов лечения инсульта применяются различные модели на животных. Очевидно, что для адекватной оценки влияния исследуемого метода терапии инсульта в эксперименте необходимо использовать модель ишемического инсульта, позволяющую воспроизводить стандартный очаг инфаркта головного мозга.

Целью данного исследования является сравнение двух способов моделирования ишемического инсульта у крыс с последующим анализом площади инфаркта головного мозга и оценки поведенческих тестов. Исследование проведено на крысах-самках, разделённых на две группы. На первом этапе всем крысам слева продольным

разрезом кожи от угла глаза до наружного отверстия слухового прохода открывали оперативный доступ к височной кости и высверливали трепанационное отверстие диаметром 4–5 мм. Под операционным микроскопом с помощью термокоагулятора выполняли окклюзию средней мозговой артерии (СМА). На втором этапе операции подопытным животным для снижения кровоснабжения в виллизиевом круге перевязывали правую (группа № 1, n=6) или левую (группа № 2, n=6) сонную артерию.

Через 3 недели после операции подопытных крыс выводили из эксперимента, перфузировали раствором формалина, головной мозг выделяли из черепной коробки. При макроскопическом исследовании у крыс обеих экспериментальных групп в теменной доле Par¹ головного мозга выявлен очаг инсульта, соответствующий месту окклюзии СМА. Морфометрический анализ площади инфаркта показал, что у крыс первой группы (медиана = 0.74, IQR: 0.57–0.98) значения были значительно меньше, чем у крыс второй группы (медиана = 5.42, IQR: 2.59–12.83) (W = 2, p = 0.03175). Однако статистический анализ результатов поведенческих тестов «липкая лента», «ходьба по лестнице» и «открытое поле» не обнаружил значимых различий в сенсомоторной реакции у всех подопытных крыс.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что окклюзия СМА в сочетании с перевязкой сонной артерии на противоположной стороне приводит к формированию мелкоочагового инфаркта мозга, меньшего по площади, чем при перевязке сонной артерии на ипсилатеральной стороне. Поведенческий анализ свидетельствует о несоответствии топографии очага инсульта с областью мозга, отвечающей за выполнение используемых тестов.

Работа выполнена при поддержке гранта АН РТ № 09-0117-ч Г/2019.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

Диана Константиновна Матвеева, Елена Ромуальдовна Андреева

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

dianis-genius@mail.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются важными посредниками для восстановления тканей, поскольку обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки, а также секретируют широкий спектр биологически активных молекул. В современных исследованиях для доставки клеток в участки повреждения разрабатываются различные биоразлагаемые скаффолды. Использование внеклеточного матрикса (ВКМ) — основного компонента ниши МСК, может иметь преимущество перед биоинженерными конструкциями, поскольку молекулы децеллюляризованного ВКМ (дцВКМ) сохраняют биологические сигналы, обеспечивающие эффективные репаративные функции клеток.

Существует несколько различных протоколов децеллюляризации. Однако ВКМ клеток различных типов отличается по качественным и количественным параметрам, поэтому необходима оптимизация протоколов децеллюляризации ВКМ МСК из жировой ткани человека (жтМСК). В настоящем исследовании при получении дцВКМ от жтМСК сравнивали эффективность

гипотонического и изотонического вариантов подхода с использованием Triton X-100 в комбинации с NH₄OH, а также возможность использования дцВКМ после формирования сфероидов.

Полученные препараты оценивали качественно с помощью иммуноцитохимии и сканирующей электронной микроскопии. Иммуноцитохимически идентифицировали белки внеклеточного матрикса жтМСК и выявили ультраструктуру ВКМ в пространстве между жтМСК в монослое. После децеллюляризации с использованием изотонического раствора Triton X-100/NH₄OH дцВКМ сохранял структуру, близкую к нативной. При использовании водного раствора Triton X-100/NH₄OH не удалось получить однородного слоя дцВКМ, на сканирующей электронной микроскопии были выявлены единичные волокна ВКМ. При собирании клеточных сфероидов под действием RGD-пептидов (цикло-*RGDfK* (TPP)), на подложке были обнаружены фрагменты матрикса и клеток, что не позволило считать этот метод эффективным для получения дцВКМ жтМСК.

Таким образом на препаратах, полученных после децеллюляризации жтМСК изотоническим раствором Triton X-100/NH₄OH, сохраняется однородный слой с густой сетью дцВКМ. Полученные данные могут быть полезными для нужд регенеративной медицины, с точки зрения использования дцВКМ в качестве материала для скаффолдов, а также для изучения взаимодействия МСК с ВКМ, как компонентом их микроокружения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 19.

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И ТЕСТИРОВАНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Сергей Петрович Медведев¹⁻⁴, Эльвира Махаловна Байрамова^{1,4}, Динара Витальевна Шарипова^{1,4}, Виктория Романовна Коваленко¹⁻⁴, Елена Викторовна Григорьева¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Лаборатория эпигенетики развития, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

² Лаборатория молекулярной и клеточной медицины, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Лаборатория геномных медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Факультет естественных наук, лаборатория клеточной инженерии, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

medvedev@bionet.nsc.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Молекулярно-генетические механизмы БП на данный момент изучены недостаточно. Одним из перспективных способов решения данной проблемы является создание

клеточных моделей, которые позволят изучать конкретные механизмы патогенеза данной болезни *in vitro*, и, следовательно, позволят глубже понять причины и выявить роль различных молекул в развитии патологических процессов. Одними из патологических проявлений болезни Паркинсона на клеточном уровне являются повышенная продукция и чувствительность к активным формам кислорода, а также формирование цитотоксичных (олигомерных) форм белка α -синуклеин.

В рамках данной работы были получены и охарактеризованы линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента (женщина 55 лет, с ранним дебютом БП — в 38 лет), имеющего полиморфизм с.С1256Т в гене *LRRK2*. На основе данных линий, с применением CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе *AAVS1*, были созданы трансгенные клоны, несущие доксициклин-управляемый трансген биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона — Cyto-Grx1-roGFP2. Используя эту же схему были получены клоны ИПСК содержащие доксициклин-управляемый трансген α -синуклеина (*SNCA*), имеющий на С-конце эпитопы 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, предназначенные для тандемной аффинной очистки белковых комплексов. Показано, что ИПСК, несущие доксициклин-управляемый трансген Cyto-Grx1-roGFP2 могут быть направленно дифференцированы в производные, которые экспрессируют маркеры характерные для дофаминергических нейронов (TH, LMX1A, FOXA2, NURR1) и общий нейрональный фактор (β -III-тубулин). Кроме того, была подтверждена активность биосенсора Cyto-Grx1-roGFP2 в условиях окисления/восстановления внутриклеточной среды на клетках, прошедших дифференцировку в сторону дофаминергических нейронов. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот анализа подтверждена управляемая экспрессия трансгена *SNCA* с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II на С-конце белка. Показано, что наличие эпитопов не мешает формированию димерных форм α -синуклеина.

Таким образом, была создана клеточная платформа для качественного и количественного исследования окислительно-восстановительного потенциала глутатиона и изучения интерактома α -синуклеина в релевантных типах клеток пациента, страдающего болезнью Паркинсона.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04011 мк.

ИНДУЦИРОВАННАЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА КЛОТНО ПОДАВЛЯЕТ РОСТ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ РАБДОМИОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Всеволод Викторович Мелехин¹⁻³, Анна Владимировна Щеглова¹, Олег Германович Макеев¹⁻³

¹ Отдел молекулярных и клеточных технологий, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

² Лаборатория технологий клеточной и генной терапии, ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия;

³ Инновационный центр химико-фармацевтических технологий, УрФУ, Екатеринбург, Россия

melekhinvv@mail.ru

Недостаточная эффективность применяемых средств терапии злокачественных новообразований, сочетающаяся с повреждением интактных тканей, обуславливает

высокую актуальность проблемы разработки принципиально новых подходов для борьбы с онкопатологией.

Настоящее исследование является попыткой оценки влияния гиперэкспрессии гена *KLTHO* (*KL*) на жизнеспособность культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека *in vitro*.

Исследование проведено на линии клеток Rd. В клетках, посредством невирусной генетической конструкции (Addgene plasmid, 17713), моделировали гиперэкспрессию секретируемой формы *KL*. В качестве оценки жизнеспособности исследуемых клеточных культур использовали МТТ-тест. Также определяли уровни ферментативной активности митохондриальных оксидоредуктаз, лактатдегидрогеназ (ЛДГ) и ферментов апоптоза, относящихся к семейству каспаз. С использованием радиоактивно меченого предшественника тимина (³H-тимидин) исследована интенсивность синтеза ДНК.

Результаты МТТ-теста, проведенного на 3-суточном интервале наблюдения, продемонстрировали постепенное снижение жизнеспособности клеток линии Rd под влиянием гиперэкспрессии *KL*. Максимальные различия опытной группы от контроля составили 42,2% ($p < 0,001$). В клетках рабдомиосаркомы под влиянием гиперэкспрессии гена *KL* определено снижение активности митохондриальных оксидоредуктаз на 5,8% относительно контроля ($p < 0,05$). Уровень активности ЛДГ в клетках опытной группы снизился на 9,4% ($p < 0,05$). Между тем, гиперэкспрессия гена *KL* способствовала повышению активности ключевых ферментов, задействованных в реализации программируемой клеточной смерти: доля клеток с повышенной активностью каспаз возросла более чем на 52% ($p < 0,001$). Статистически значимое влияние гиперэкспрессии гена *KL* также было определено для параметра интенсивности синтеза ДНК, ингибирование которого составило 8,4% относительно контроля ($p < 0,05$).

Зарегистрированный феномен свидетельствует о выраженном онкосупрессивном эффекте гена *KL* в отношении клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека. При этом изменение ферментативной активности опухолевых клеток, в качестве гипотезы, может быть объяснено ингибированием процессов энергетического обмена под влиянием *KL*. Несмотря на то, что роль гена *KL* в контексте канцерогенеза остается во многом не определенной, имеющиеся на сегодняшний день сведения демонстрируют высокий потенциал данного гена как супрессора опухолевого роста.

НОВЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВОК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Александра Викторовна Мелешина¹,
Светлана Алексеевна Родимова¹,
Дмитрий Георгиевич Реунов¹, Екатерина
Павловна Калабушева^{2,3}, Эрдэм Баирович
Дашинимаев^{2,3}, Екатерина Андреевна
Воротеляк²⁻⁴, Елена Вадимовна Загайнова¹

¹ НИИ ЭО и БМТ, ФГБОУ ВО «Приволжский
Медицинский Университет» Минздрава России,
Нижний Новгород, Россия;

² Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова
РАН, Москва, Россия;

³ Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия;

⁴ Биологический факультет, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

almele@ya.ru

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) — перспективный инструмент клеточной терапии. Актуальным направлением является применение пациент-специфических ИПСК в клеточной заместительной терапии, где возможна предварительная коррекция аутологичного материала пациентов, с последующей трансплантацией. С появлением новых технологий индукции направленной дифференцировки ИПСК актуальной задачей становится поиск чувствительных параметров оценки эффективности дифференцировки. Такими параметрами могут выступать метаболизм и вязкость цитоплазматической мембраны. В работе проведена направленная дифференцировка ИПСК в эпидермальном и нейральном направлениях. Анализ метаболической активности проводили на основе кофактора НАД(Ф)Н и FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy). Данные о вязкости цитоплазматической мембраны получали с использованием FLIM и молекулярного ротора. В процессе дифференцировки ИПСК в предшественники кератиноцитов (ПрК) и дальнейшей дифференцировки в кератиноциты наблюдали увеличение вкладов времен жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н (ИПСК — 17,7±1,04%, ПрК — 20,6±1,07%, кератиноциты — 24,7±1,04%) что, вероятно, связано со сдвигом метаболических путей в сторону окислительного фосфорилирования (ОКФОС). Нейральные стволовые клетки (НСК) характеризовались также более высокими значениями вкладов времен жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н, чем ИПСК, и соответственно более окислительным статусом. Однако в нейронах, основываясь на данных о времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н, мы обнаружили обратное переключение на более гликолитичный метаболизм по сравнению с ИПСК (НСК — 20,9±1,9%, нейроны — 12,1±2,7%). Вязкость мембраны в ИПСК составила 482,41±81,7 сПз. При эпидермальной дифференцировке наблюдали уменьшение вязкости мембран (ПрК — 384,04±83,73 сПз и кератиноциты — 331,58±83,4 сПз). В НСК детектировали снижение вязкости до 340,9±94,09 сПз и в нейронах до 474,3±113,04 сПз. Таким образом, значимые изменения, проявляющиеся еще на стадии предшественников, наблюдали по обоим параметрам. Изменения вязкостных свойств мембраны и метаболической активности могут стать эффективными при оценке клеток, выходящих из плюрипотентного состояния. Оценка данных

параметров с использованием высокотехнологичных подходов в дальнейшем может стать потенциальным параметром оценки эффективности технологий направленной дифференцировки ИПСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 17-75-20178).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИМПЛАНТАЦИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ МАТРИКСОВ КОЖИ СВИНЬИ

Карина Игоревна Мелконян¹, Александр Сергеевич Сотниченко¹, Ирина Валерьевна Гилевич², Татьяна Викторовна Русинова¹, Яна Андреевна Юцкевич¹, Антон Владимирович Каракулев², Сергей Борисович Богданов², Илья Михайлович Быков³, Владимир Алексеевич Порханов², Андрей Николаевич Редько³, Сергей Николаевич Алексеенко³

¹ Лаборатория фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИП ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия;

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт Краевая клиническая больница № 1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Россия;

³ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия

alex24.88@mail.ru

Возможность применения рецеллюляризованных фибробластами дермальных матриксов при повреждении кожи делает их перспективными для широкого клинического применения для заживления ран с нарушениями кожной поверхности.

Цель исследования: оценка результатов имплантации ацеллюлярных и рецеллюляризованных дермальных матриксов на модели кожной раны свиньи.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на поросенке породы Ландрас с массой тела 25,5 кг. На спине животного при помощи дерматома была сформирована глубокая кожная рана — 15×5 см. Для закрытия раневой поверхности были использованы децеллюляризованные детергент-энзиматическим методом матриксы кожи свиньи с применением Тритона Х100 и дезоксихолата натрия и матриксы, рецеллюляризованные дермальными фибробластами свиньи. Фибробласты выделяли ферментативным методом и культивировали до 2 пассажа. Для морфологической оценки результатов имплантации проводили гистологическое исследование биоптатов биоматериалов на 2, 5, 8, 16, 20 сутки эксперимента.

Результаты. После имплантации в децеллюляризованном матриксе и окружающих тканях развилась воспалительная реакция с преобладанием лимфомакрофагального инфильтрата с последующим образованием рубцовой ткани к 11 суткам. Исследование рецеллюляризованных фибробластами образцов матрикса показало, что на 2–5 сутки также развивалась воспалительная реакция, однако она происходила только в окружающих тканях и участках матрикса, граничащих с дном раны. При этом была отмечена периваскулярная пролиферация фибробластов с появлением дермального слоя, толщиной до 200 мкм. На 8 сутки под матриксом толщина новообразованного дермального слоя увеличилась до 1 мм. Обнаружено образование плоского

неороговевающего эпителия толщиной до 5 слоев. Верхняя часть матрикса оставалась интактной, без признаков воспаления. На 16 сутки толщина новообразованной дермы достигла 2 мм, в ней выявлено большое количество новообразованных сосудов и пролиферирующих фибробластов. Число слоев эпидермиса достигло 15, в том числе появился роговой слой. На 20 сутки прогрессивно увеличилось количество новообразованных сосудов и очагов пролиферации фибробластов и кератиноцитов. Число слоев эпидермиса при этом достигло 25.

Заключение. Полученные результаты показали наличие репаративных изменений при закрытии раневой поверхности на модели кожной раны свиньи рецеллюляризованными фибробластами дермальными матриксами.

Работа выполнена в рамках комплексной НИР (рег. № АААА-А16-116042550089-5 от 25.04.2016).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИМИДИНКИНАЗЫ ДЛЯ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СЕЛЕКЦИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Алексей Гаврилович Мензоров^{1,2}, Константин Евгеньевич Орищенко¹, Мария Михайловна Гридина¹, Вениамин Семенович Фишман^{1,2}, Олег Леонидович Серов^{1,2}, Анна Александровна Кашеварова³, Татьяна Владимировна Никитина³, Игорь Николаевич Лебедев³

¹ ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

menzorov@bionet.nsc.ru

Применение дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в клеточной терапии потенциально опасно из-за риска формирования опухоли. Для элиминации клеток донора была предложена стратегия «суицидальной кассеты», содержащей «ген-самоубийцу» (suicide gene). В клетки донора вводится генетическая конструкция, содержащая тимидинкиназу (ТК) вируса герпеса, преобразующую ганцикловир в токсичный монофосфат. При действии ганцикловира клетки гибнут. Мы поставили задачу изучить влияние места встройки «суицидальной кассеты» на выживание ИПСК при обработке ганцикловиром *in vitro*.

Мы ввели в линию ИПСК iTAFdup22, имеющую dup3p26.3, затрагивающую ген *CNTN6* (Gridina et al., 2018), генетические конструкции, содержащие ТК под конститутивным промотором. Оказалось, что селекция ганцикловиром не всегда приводит к гибели всех клеток. При обработке пяти миллионов клеток мы наблюдали следующие результаты: в клонах iTAFdup22-308, iTAFdup22-347 и iTAFdup22-348 происходила ожидаемая гибель всех клеток. В клонах iTAFdup22-e5, iTAFdup22-320 и iTAFdup22-425 образовалось от 40 до более сотни субклонов, причем выборочный анализ 55 субклонов выявил потерю ДНК трансгена только в одном.

Есть три возможных механизма элиминации продукта гена ТК: 1) эпигенетическое замолчание (предполагается в клонах iTAFdup22-e5, iTAFdup22-320 и iTAFdup22-425); 2) микроделеция

участка хромосомы с ТК (показана для одного субклона); 3) элиминация гомолога хромосомы с трансгеном с последующей редупликацией интактного гомолога (не выявлена). Можно предположить, что замолкание трансгена происходит при встройке в районы неактивного хроматина. Мы установили место встройки трансгена в клоне iTAFdup22-425 — это ген *CNTN6*, участвующий в нейрогенезе. Район гена *CNTN6* в ИПСК богат маркерами неактивного хроматина, возможно, это увеличивает вероятность замолкания трансгена. Мы планируем установить места встройки трансгенов в остальных клонках. Полученные в настоящее время результаты позволяют предположить, что для эффективной работы «суицидальной кассеты» и дальнейшего применения в клеточной терапии необходимо корректно выбирать место встройки.

Линии клеток депонированы в ЦКП «Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепроцессуального и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL; <http://ckp.icgen.ru/cells/>).

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10231-П.

ВОЗДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ КЛЕТЧНОГО СИГНАЛИНГА, ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И АУТОФАГИИ НА ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ПОЛЯРИЗОВАННЫХ МАКРОФАГОВ

Михаил Юрьевич Меньшиков, Екатерина Сергеевна Зубкова, Юрий Сергеевич Стафеев, Светлана Сергеевна Мичурин

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

myumensh@mail.ru

В регуляции динамики воспаления, обеспечивающего нормальное заживление поврежденных тканей, основную роль играют макрофаги, способные к поляризации в провоспалительный (M1) и противовоспалительный (M2) фенотип, при участии клеточного сигналинга, энергетического метаболизма и аутофагии.

Анализ поверхностной экспрессии антигена F4/80 в макрофагах мыши линии RAW2645.7 выявил ее повышение в популяции M1 по сравнению с M2 фенотипом. Активация сиртуина-1 и рецепторов PPAR γ их агонистами снижала экспрессию F4/80 в M1 макрофагах, но не оказывала влияния на экспрессию CD206 в M2 макрофагах, в то время как ингибитор провоспалительной киназы IKK не оказывал существенного влияния на экспрессию F4/80 в M1 макрофагах, но значительно увеличивал экспрессию CD206 в M2 макрофагах.

Уровень аутофагии, оцениваемый по увеличению флуоресценции зонда Cyto ID, был выше в M1, чем в M2 или MO макрофагах, существенно снижался в присутствии ролитинина, в меньшей степени — в присутствии активаторов сиртуина-1 и PPAR- γ , и не менялся в присутствии ингибиторов воспалительного сигналинга, и гликолиза.

Ингибитор аутофагии 3-метиладенин (ЗМА) усиливал экспрессию F4/80 только в M1 макрофагах, и экспрессию CD206 в M2 макрофагах, наряду с экспрессией трансформирующего фактора роста, аргиназы-1, индол-диоксигеназы и ФНО- α .

Сравнение линейных макрофагов мыши с макрофагами крови человека выявило ряд отличий, в частности

макрофаги периферической крови характеризовались повышенной экспрессией антигена CD80/86 в M1 фенотипе и CD206 в M2 популяции. При этом уровень аутофагии был существенно снижен в M1 популяции в сравнении с неполяризованными (MO) и M2 макрофагами. Воздействие ЗМА, а также ингибирование гликолиза или митохондриального дыхания существенно снижали уровень аутофагии в MO и M2, не влияя на процесс в M1 макрофагах.

Полученные данные свидетельствуют о возможности влияния клеточного сигналинга, энергетического метаболизма и аутофагии на экспрессию маркеров, характеризующих поляризацию макрофагов в провоспалительном и противовоспалительном направлении.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ, № 18-015-00398.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА МИКРОСФЕРАХ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

Ксения Андреевна Меньшик¹, Вера Владимировна Воинова¹, Татьяна Константиновна Махина², Гарина Александровна Бонарцева², Константин Вольдемарович Шайтан¹, Антон Павлович Бонарцев¹

¹ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

kamenshikh@gmail.com

В настоящее время разработка противоопухолевых препаратов требует достоверных методов тестирования на этапе доклинических испытаний, в том числе создания переходного этапа между исследованиями в монослое и в организме. К таким моделям для скрининга *in vitro* относят трёхмерные системы клеточных культур.

Цель данной работы — создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата (ПОБ).

Для получения пористых микросфер с диаметрами от 50 до 100 и более 100 мкм использовался метод «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» (W/O/W) с последующим вымыванием порообразователя. В качестве порообразователя использовался водный раствор карбоната аммония из-за его способности к термическому разложению до аммиака и углекислого газа.

Выбор клеточной линии — HEp-2, рак гортани человека — был обусловлен тенденциями частоты случаев заболевания различными видами рака головы и шеи. Для получения стабильных сфероидов клетки в суспензии совместно с пористыми микросферами из ПОБ переносили на лунки, покрытые 1% агарозным гелем. В условиях постоянного перемешивания, температуры 37°C и 5% содержания CO₂ клетки культивировали совместно с микросферами в течение 14 суток со сменой среды каждые 2 дня. Динамика клеточного деления и роста в сфероиде отслеживалась посредством МТТ-анализа и измерением концентрации белка по Брэдфорду, морфология сфероидов и распределение клеток оценивались визуально с помощью сканирующей электронной (СЭМ) и конфокальной микроскопии.

Согласно полученным результатам, рост сфероидов достигал пика на 7-ые сутки культивирования, после чего число живых клеток падало как в контроле (сфероиды из клеток), так и в опыте (сфероиды из клеток

с микросферами). При этом при культивировании с микросферами диаметром 50–100 мкм наблюдалась более активная пролиферация клеток, чем в контроле и в сфероидных с микросферами более 100 мкм. Исследование при помощи СЭМ также показало лучшее прикрепление и агрегацию клеток с микросферами меньшего диаметра.

Подобный подход к созданию 3D клеточных моделей из опухолевых клеток с использованием ПОБ является перспективным для получения систем для тестирования противоопухолевых препаратов. Более полное понимание механизмов будет достигнуто посредством анализа экспрессии различных транскрипционных факторов и в ходе масштабирования процесса до культивирования в большем объеме с постоянной циркуляцией питательной среды.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ мк № 18-29-09099.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СКАФФОЛДОВ И БИОПЕЧАТИ

Никита Владимирович Минаев

Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия
minaevn@gmail.com

В настоящее время лазерная техника широко применяется в различных областях медицины, таких как пластическая хирургия, онкология, офтальмология и других для лечебного воздействия на биоткани. Различные лазерные технологии используются для формирования искусственных каркасов — скаффолдов из биосовместимых и биорезорбируемых материалов, а также печати живыми микрообъектами, такими как отдельные клетки и микроорганизмы, а также клеточные сфероиды. Комбинация таких технологий позволяет создавать сложные тканеинженерные конструкции, способные постепенно замещаться нормальными тканями в организме.

В докладе будут представлены результаты ведущихся исследований, направленных на формирование скаффолдов методами одно- и двухфотонной фотополимеризации растворов фотоотверждаемых композиций, а также с помощью поверхностно-селективного лазерного спекания из оригинальных биосовместимых и биорезорбируемых материалов. Ведется разработка трехмерных скаффолдов, пригодных для лечения поврежденной костной, хрящевой и нервной ткани.

Разработаны программно-аппаратные комплексы для реализации печати по технологии прямого лазероиндуцированного переноса живыми клетками и клеточными сфероидными для биофункционализации изготовленных скаффолдов.

Разработана технология ЛИМС (Лазерная Инженерия Микробных Систем) и программно-аппаратные комплексы для выделения и пространственного переноса отдельных бактерий, клеток и их агрегатов с помощью импульсов давления, создаваемых наносекундным лазерным излучением. Предложенный подход позволил реализовать высокоэффективную трехмерную печать живыми микробиологическими объектами, а также выделять микроорганизмы, трудно культивируемые или некультивируемые стандартными способами.

Сочетание предлагаемых лазерных методов и технологий является перспективным для решения ряда важных задач в области медицины, тканевой инженерии и микробиологии.

Работа ведется при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-32-20184); Российского научного фонда (проект № 19-75-00108); Стипендии Президента Российской Федерации № СП-2728.2019.4.

ПОВЫШЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА В ЕГО СОЧЕТАНИИ С ОСТЕОКОНДУКТИВНЫМ КОЛЛАГЕНОВЫМ МАТРИКСОМ

Владислав Валентинович Минайчев¹, Полина Олеговна Теплова^{1,2}, Ксения Андреевна Меньших³, Ирина Сергеевна Фадеева¹, Алёна Игоревна Звягина¹, Алина Сергеевна Одинцова³, Владимир Семёнович Акатов¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

² ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

³ ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

vminaychev@gmail.com

Разработка остеопластических материалов на основе наноразмерного синтетического гидроксиапатита (нГАп) является одной из актуальных задач реконструктивной хирургии костной ткани. Большой интерес к нГАпу связан с его схожестью с ГАпом костной ткани и показанными в ряде работ остеоиндуктивными свойствами (ОС). Однако также известно, что частицы нГАп обладают дозозависимым цитотоксическим эффектом, что может приводить к развитию неконтролируемого воспаления на материал вплоть до отторжения. Подобные противоречия говорят о недостаточности знаний о факторах, определяющих успешную интеграцию нГАп в организме и необходимости их изучения.

В проведенных исследованиях был выявлен ряд факторов, ограничивающих биоинтеграцию нГАп в организме, такие как слабые адгезионные свойства и агрегация нГАп в организме, а также, на основе полученных данных, предложен способ повышения остеоиндуктивных свойств деминерализованного костного матрикса (ДКМ) при помощи нГАп.

В исследованиях *in vitro* на культуре стромальных клеток пульпы зуба человека было показано, что нГАп не способен обеспечивать адгезию клеток к своей поверхности, что приводит к их аноикису. Исследования *in vivo* в модели гетеротопической имплантации показали, что нГАп образует слабрезорбирующийся агрегат, блокирующий миграцию клеток в материал, а также процессы неокколагенеза на нем, включая инкапсуляцию материала. Добавление к нГАП костной крошки, полученной из ДКМ, в качестве остеокондуктора способствовало заселению материала клетками, резорбции нГАп и построению неокколагенового матрикса.

На основании полученных данных был предложен способ увеличения ОС ДКМ путем его реминерализации нГАпом. Реминерализованный ДКМ (рДКМ) получали путем инкубации ДКМ в суспензии нГАп.

Исследование рДКМ *in vitro* показали слабые адгезионные свойства рДКМ, по сравнению с ДКМ, однако при гетеротопической имплантации модифицированного

рДКМ наблюдалась минерализация трабекул рДКМ и формирование неоколлагеновых трабекулоподобных структур, что не наблюдалось в ДКМ. Все это свидетельствует об увеличении ОС ДКМ.

Представленные результаты указывают на необходимость сочетания нГАп с остеокондуктором с целью предотвращения его агломерации и повышения ОС. Также полученные данные показывают перспективность подхода повышения ОС ДКМ путем его реминерализации нГАпом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (СП-1275.2019.4) и Фонда содействия инновациям, с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

АРОА-1 СПОСОБСТВУЕТ СОХРАНЕНИЮ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Светлана Михайловна Мирошниченко^{1, 2}, Анастасия Олеговна Соловьева¹, Иван Федорович Усынин²

¹ НИИКЭЛ — филиал Института Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НИИ биохимии Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальной и Трансляционной Медицины, Новосибирск, Россия

svmiro@yandex.ru

Уникальные свойства мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) позволяют рассматривать их в качестве терапевтического агента многих заболеваний. Клинические исследования подтвердили безопасность клеточной терапии МСК, однако данные по их эффективности противоречивы. Снижение эффективности связывают с низкой выживаемостью трансплантированных клеток. Клеточная терапия на фоне СД 2 типа осложнена токсическими метаболитами и высоким уровнем активных форм кислорода (АФК). В нашей работе мы проанализировали влияние сывороток крови 80 пациентов СД 2 типа на функциональную активность МСК. Было показано, что 35,6% сывороток снижали выживаемость клеток более чем на 40%, в то время как контрольные сыворотки повышали выживаемость клеток до $115 \pm 20\%$. В условиях моделируемого окислительного стресса у 41% сывороток отсутствовали защитные антиоксидантные свойства. Известно, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и их основной компонент — белок АроА-1 обладают антиоксидантными свойствами. Было показано функциональное нарушение ЛПВП и АроА-1 у пациентов с СД 2 типа.

Нами установлено, что АроА-1 проникает в МСК, повышая выживаемость клеток в условиях депривации сыворотки на 11%. Уровень включения Н³тимидина был на $35 \pm 3\%$ выше в присутствии белка в течение 18 часов. АроА-1 повышает процент клеток в S-G2/M фазах клеточного цикла в 1,5 раза по сравнению с контролем в бессывороточной среде. Депривация сыворотки и кислорода вызывала накопление клеток до $80 \pm 2\%$ в фазах G0/G1 с отсутствием апоптотической гибели. АроА-1 в этих условиях не влиял на показатели пролиферации клеток, тем самым не нарушая физиологический переход клеток в фазы G0/G1 в неблагоприятных условиях. В условиях моделируемого окислительного стресса ($100-500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (24ч)) происходит

активация пролиферации МСК с увеличением гибели клеток в первые часы инкубации. Добавление АроА-1 способствовало поддержанию нормального уровня пролиферации, снижению апоптоза и повышению общего количества клеток в 1,5 раза. Эффект АроА-1 был дозозависимым. Так, для проявления защитного эффекта АроА-1 при добавлении $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ требуется в 4 раза больше белка (40 мкг/мл).

Таким образом, АроА-1, предохраняет клетки от перекисного окисления, поддерживает жизнеспособность клеток и пролиферативный потенциал в условиях сывороточного голодания и может быть использован в качестве компонента бессывороточных сред для целей культивирования и трансплантации на фоне метаболических нарушений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 18-75-10057).

ИНДУКЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО МОРФОГЕНЕЗА И АДАПТАЦИОННЫХ РЕЗЕРВОВ В ИШЕМИЗИРОВАННОМ МИОКАРДЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОГО ФЕНОТИПА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Вячеслав Юрьевич Михайличенко, Сергей Александрович Самарин

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия

pancreas1978@mail.ru

Актуальность. Клеточная терапия на основе МСК является одним из наиболее перспективных и инновационных направлений развития медицины и уже сегодня позволяет получить качественно новые клинические результаты в различных областях. Цель. провести оценку влияния трансплантации МСК клеток при системном их введении на удельное количество сосудов в ишемизированном участке миокарда и функциональные показатели сердца. **Материалы и методы.** Крысы самки линии Wistar-Kayoto в количестве 90 особей были разделены на 3 экспериментальные группы: группа А (контрольная) — животные с экспериментальным ИМ без какого-либо лечения ($n=30$); группа В — животные, которым на фоне ИМ выполняли трансплантацию МСК ($n=30$); группа С — животные, которым на фоне ИМ выполняли трансплантацию коммитированных МСК ($n=30$). Моделирование ИМ мы выполняли на самках, а использовали культуру ММСК самцов (получение коммитированных клеток производилось на 3-и сутки по стандартной методике путем добавления в культуральную среду 5-азациитидина), чтобы в дальнейшем по Y-хромосоме верифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента. Клеточную кардиомиопластику осуществляли непосредственно после моделирования ИМ путем внутривенного введения культуры клеток. **Результаты.** При сопоставлении данных массы левого желудочка (ЛЖ) не было различий между группой контроля $0,62 \pm 0,05$ г и группой (b) $0,6 \pm 0,05$ г ($t=1,15$, $p=0,25$). В остальных группах масса ЛЖ значительно меньше нормы. При изучении изменений интегрального показателя LW/BW мы отметили, что между нормой $0,2 \pm 0,02$ и (b) группой $0,2 \pm 0,02$ нет различий ($t=0,93$, $p=0,36$). Однако существует различия группы контроля по сравнению с (c) группой $0,18 \pm 0,01$ ($t=4,5$, $p=0,001$); (a) группой $0,16 \pm 0,01$ ($t=8,67$,

$p=0,001$). Следует отметить, что в группе с ИМ без лечения фракция выброса снижалась до $46,8 \pm 0,8\%$ ($t=4,53$; $p>0,05$). Практически по всем изученным показателям в группе (b) были достигнуты существенным образом лучшие результаты в сравнении с нелечеными животными, причем уровень достоверности различий был как правило меньше 0,01. Особенно впечатляющие результаты получены при исследовании удельного количества сосудов на 100 тыс. мкм² ($10,21 \pm 1,26$ без лечения в сравнении с $68,2 \pm 4,64$ у крыс с моделью острого ИМ после введения ММСК). Выводы. Трансплантация ММСК костного мозга при ИМ оказывает существенное положительное влияние на сократительную функцию сердца, толерантность к физическим нагрузкам и морфологическую картину миокарда.

НЕМИЗЛОАБЛАТИВНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КАК СПОСОБ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Вячеслав Михайлович Михайлов¹, Анастасия Владимировна Соколова¹, Елена Васильевна Каминская¹, Надежда Степановна Скрипкина², Наталья Александровна Тимонина³, Виолетта Васильевна Кравцова³, Игорь Ильич Кривой³

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Городская больница № 31, Санкт-Петербург, Россия;

³ Кафедра Физиологии СПб Государственного Университета, Санкт-Петербург, Россия

vmikhailov@incras.ru

Трансплантация миобластов мышам mdx была началом клеточной терапии (КТ) моногенного заболевания (МЗ) миодистрофии Дюшенна (МДД) (Partridge et al., 1989). За 30 лет в поперечно-полосатых мышечных волокнах (ППМВ) при помощи КТ не удалось восстановить синтез дистрофина (СД), сопоставимого по продолжительности с жизнью как больных МДД так и экспериментальных животных. Мы применили внутривенную немизлоаблативную трансплантацию (НМАТ) аллогенных клеток костного мозга (ККМ) мышей C57BL/6 мышам mdx (C57BL/10), облученных лучами Рентгена (РО) в дозе 3 Гр, без использования в течение опыта иммуносупрессоров (Соколова и др., 2010; Mikhailov et al., 2012). Через 6 месяцев (мес) после РО степень химеризма мышей mdx, выявленная при помощи трансплантации GFP(+) ККМ C57BL/6, была $3,3 \pm 0,8\%$. СД оценивали иммуноморфологически как долю дистрофин (+) ППМВ (ППМВ(Д+)) в бедренной мышце и диафрагме в течение года после РО. У химер-mdx после РО в дозе 5 Гр и выше усиления СД не наблюдали (Михайлов и др., 2006). При РО в дозе 3 Гр в бедренной мышце химер-mdx СД возрастал от $1,1 \pm 0,4\%$ до $28 \pm 7\%$ Д(+)-ППМВ через 6 мес после трансплантации ККМ и понижался до $5 \pm 1\%$ через 12 мес. Доля ППМВ без центральных ядер возрастала от $10 \pm 1\%$ до $23 \pm 2\%$ на 6 мес и уменьшалась до $11 \pm 1\%$ в конце года. При этом доля погибающих ППМВ к концу года уменьшалась от $2,2 \pm 0,6\%$ до $0,5 \pm 0,1\%$. В ППМВ диафрагм химер-mdx СД возрастал от $0,3 \pm 0,3\%$ до $12 \pm 0,4\%$ через 6 мес. и уменьшался до $2,6 \pm 0,7\%$ через 9 и до $1,5 \pm 0,3\%$ ППМВ(Д+) на 12 мес после трансплантации ККМ. Структуру синапсов оценивали после окраски срезов мышц tetramethylrhodamin- α -bungarotoxin-ом. У химер-mdx доли синапсов «дикого» типа в виде «ветвей» росли от исходных 14% до 43%,

49%, 48%, и 37% на 4, 8, 11 и 12 мес после РО и НМАТ ККМ. В синапсах также полностью восстанавливались потенциал покоя и гиперполяризация концевых пластинок (Кравцова и др., 2011). Результаты показывают, что трансплантированные аллогенные ККМ в условиях НМАТ поддерживают СД в мышцах химер-mdx в течение года. НМАТ ККМ успешно используется для лечения МЗ серповидно-клеточной анемии взрослых пациентов (Vermylen, 2013). Обсуждается перспективность применения метода немизлоаблативной трансплантации ККМ для лечения МДД и других моногенных заболеваний.

РНФ № 14-50-00068.

РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА В ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Илья Александрович Михайлов, Наталья Владимировна Данилова, Нина Александровна Олейникова, Павел Георгиевич Мальков, Нуршат Минуллаевич Гайфуллин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

imihailov@mc.msu.ru

Введение. Неоваскуляризация (ангиогенез) является неотъемлемой частью процесса регенерации, в том числе в слизистой оболочке желудка. Рост грануляционной ткани и образование новых микрососудов посредством ангиогенеза стимулируется FGF, VEGF, PDGF, ангиопоэтинами, IL-1 и TNF- α . Часть из этих факторов может продуцироваться клетками иммунной системы — Т-хелперами и макрофагами. Известно, что опухолевые клетки стимулируют ангиогенез в прилежащих к ним участках ткани; показано, что в этом процессе важную роль играет микроокружение опухолей. В связи с этим актуальным является исследование регенераторного потенциала воспалительного ответа в перитуморальной области, клетки которого могут принимать участие в процессах неоваскуляризации.

Материалы и методы. В исследование были включены 55 случаев операционного материала рака желудка с сохраненной перитуморальной областью. Проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD4 и CD68. Число клеток с положительной реакцией подсчитывалось при увеличении $\times 200$ в перитуморальной области с дальнейшим вычислением среднего числа клеток и медианы.

Результаты. Данные экспрессии маркеров были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками рака желудка для сравнения регенераторного потенциала воспалительного ответа в эпителии перитуморальной области разных групп опухолей. Установлено, что инфильтрация Т-хелперами (CD4⁺) перитуморальной области значительно более выражена ($p<0,05$) при опухолях N3a/N3b (7 и более метастазов в регионарные лимфоузлы; медиана=41,33 клеток), чем при опухолях N0 (метастазы в регионарные лимфоузлы отсутствуют; медиана=26клеток). Инфильтрация макрофагами (CD68⁺) перитуморальной области значительно более выражена ($p<0,05$) при опухолях N2 (3–6 метастазов в регионарные лимфоузлы; медиана=92,33 клеток), чем при опухолях N0 (медиана=69,20 клеток).

Заключение. Впервые показано, что плотность инфильтрации Т-хелперами и макрофагами перитуморальной области более выражена при опухолях желудка

с большим количеством метастазов в регионарные лимфоузлы. Известно, что увеличение количества метастазов ассоциировано с большим количеством микрососудов в опухолевой ткани и прилежащих к ней участках. Таким образом, высокая плотность инфильтрации Т-хелперами и макрофагами свидетельствует о более активных процессах неоваскуляризации и регенерации в перитуморальной области при раке желудка.

Выполнено в рамках государственного задания Московского университета «Разработка, апробация и внедрение методов диагностики, лечения и реабилитации, в том числе с использованием технологий персонализированной терапии в области онкологии» Номер ЦИТИС: АААА-А17-117080110019-9.

ОЦЕНКА МИГРАЦИИ АКТИВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОТЕРАПИИ

Николай Васильевич Михайловский, Елена Вячеславовна Абакушина, Ольга Николаевна Спиченкова, Михаил Александрович Сигов, Герман Анатольевич Давыдов

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

nickmikh.mrrc@gmail.com

В настоящее время иммунотерапия онкологических заболеваний приобретает все большее значение в лечении больных со злокачественными новообразованиями. Актуальным остается изучение противоопухолевого действия иммунотерапии, в том числе основанной на введении в организм больного активированных цитотоксических лимфоцитов, терапевтический потенциал которых усилен *in vitro* с помощью цитокинов. Однако распределение лимфоцитов после введения различными способами, то есть их миграция *in vivo* остается не изученным аспектом. Для развития клеточных технологий и применения их в клинической практике необходимо получить детальную информацию о выживаемости, пространственном распределении и точной локализации трансплантированных клеток в организме реципиента.

Целью работы являлась оценка миграции меченых активированных лимфоцитов комплексом ^{99m}Tc -ГМПАО при визуализации *in vivo* у онкологических больных.

Материалы и методы. Исследование проводили с участием трёх пациентов с диагнозами: рак предстательной и молочной желез, меланома. Всем больным проводилась сопроводительная иммунотерапия активированными цитотоксическими лимфоцитами в рамках протокола клинических испытаний, одобренного этическим комитетом. Лимфоциты выделяли из крови онкологических больных по стандартному методу, подвергали активации в полной питательной среде с добавлением ИЛ-2, ИЛ-15 и ИФН- γ . Затем к клеточной массе добавляли ГМПАО-изомер, меченый ^{99m}Tc , инкубировали, проводили отмывку, определяли количество и жизнеспособность лимфоцитов после мечения, которая во всех случаях была выше 95%. Для оценки миграции лимфоцитов каждому пациенту проводили ОФЭКТ/КТ: сразу после внутрикожного введения клеток, и 2–3 часа спустя.

Основные результаты. Было показано, что после внутрикожного введения меченые активированные лимфоциты помимо мест введения обнаруживаются в лимфатических узлах различной локализации.

Накопления свободного РФП, введенного при тех же условиях, в лимфоузлах не наблюдалось. Для всех трёх клинических случаев выявлена общая закономерность: меченые активированные лимфоциты мигрировали во вторичные лимфоидные органы — лимфоузлы, часть из которых расположена рядом с областью онкологической патологии, что позволяет говорить об активации специфичного противоопухолевого иммунного ответа и состоятельности клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований в целом.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Марк Васильевич Михальченков¹, Мария Сергеевна Ребенкова², Александра Энхэевна Гомбожапова^{1,2}, Марина Ринатовна Патышева^{2,4}, Юлия Викторовна Роговская², Вячеслав Валерьевич Рябов¹⁻³

¹ *Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия;*

² *Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук НИИ кардиологии, Томск, Россия;*

³ *ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;*

⁴ *Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук НИИ онкологии, Томск, Россия*

myz-mm@yandex.ru

Введение. В настоящее время идёт активный поиск путей предотвращения неблагоприятного постинфарктного ремоделирования сердца. Одним из перспективных способов является контроль секреции моноцитами/макрофагами некоторых цитокинов. Известно, что TNF- α в низких концентрациях защищает миокард, но при высоких оказывает токсическое действие.

Цель. Изучить возможность использования культуры макрофагов, полученной из моноцитов крови пациентов с инфарктом миокарда, для дальнейшего исследования генома и эпигенома клеток. Оценить *in vitro* динамику секреции макрофагами TNF- α под влиянием IL-4 и INF- γ .

Материалы и методы. Для выделения моноцитов производился забор 30 мл крови у 3 здоровых доноров и 3 больных инфарктом миокарда на 3 (ранний срок) и 5 сутки заболевания (поздний срок). Мононуклеарную фракцию подвергали CD14⁺ сепарации по протоколу компании MytlenyBiotec (Германия). Чистоту фракции определяли путём проточной цитофлюорометрии. Количество жизнеспособных клеток определяли при помощи йодистого пропидия.

Для культивации клеток были использованы бессывороточная среда X-VIVO 10M (Cambrex) и среды содержащие IL-4 и INF- γ . На 3 и 6 сутки отбирали супернатанты и определяли концентрацию TNF- α методом ИФА тест системами «Вектор Бест».

Результаты. У здоровых доноров среднее количество мононуклеаров в крови составило $17,8 \times 10^6$ клеток, моноцитов — $6,2 \times 10^6$ клеток. У пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) эти показатели равны $18,5 \times 10^6$ и $5,8 \times 10^6$ соответственно. Чистота выделенных моноцитов составила не менее 95%, число жизнеспособных клеток — 94%.

Результаты анализа определения концентраций TNF- α в супернатантах показали, что IL-4 снижает выработку TNF- α в каждой группе. Независимо

от срока ИМ снижение наступает на 3 сутки культивации (на раннем сроке с 10,2 до 4,5 пг/мл и на позднем с 8,1 до 3,5 пг/мл). У здоровых доноров снижение отмечается только на 6 сутки (с 10,0 до 4,2 пг/мл). IFN- γ вызвал снижение секреции TNF- α у здоровых (с 10,0 до 6,2 пг/мл) и больных на раннем сроке ИМ (с 11,1 до 6,2 пг/мл) только на 6 сутки культивации.

Заключение. В ходе исследования освоена методика выделения моноцитов из венозной крови при помощи CD14⁺-позитивной магнитной сепарации с высоким уровнем чистоты и жизнеспособности моноцитов. Выявлены различия в динамике секреции TNF- α под влиянием IL-4 и INF- γ у здоровых людей и у пациентов с инфарктом миокарда в разные сроки заболевания.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В Фолликулах Волос Человека

Елена Владимировна Михальчик¹, Ольга Владимировна Морозова¹, Айнура Гашамовна Матвеева¹, Олег Михайлович Панасенко¹, Татьяна Валерьевна Цимбаленко², Аида Гусейхановна Гаджигорова³, Дмитрий Владимирович Клинов¹

¹ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия;

² Трихологический центр Татьяны Цимбаленко, Москва, Россия;

³ Институт Красивых Волос, Москва, Россия

lemik2007@yandex.ru

Рост волос контролируется системой сигналов между кератиноцитами, клетками дермального сосочка и стволовыми клетками. Известно, что интерлейкины (ИЛ) 6, 10, 23 могут координировать взаимодействие клеток волосных фолликулов (ВФ).

Цель: исследование экспрессии генов интерферонов (ИФН) 3 основных типов (α , β , γ , λ) и ИЛ на уровне транскрипции и трансляции.

Методы: ВФ в фазе анагена из зоны темени и затылка здоровых людей и пациентов с андрогенетической алопецией (АГА), извлеченные вручную, лизировали в растворе гуанидинизотиоцианата для выделения РНК или механически гомогенизировали в буферном растворе для анализа белков. Суммарные нуклеиновые кислоты из ВФ выделяли с использованием набора «Проба-НК» («ДНК-технология», Москва) и проводили обратную транскрипцию с ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Иммунофлуоресцентный анализ с использованием магнитных микросфер (xMAP) осуществляли с применением наборов 17xplex (Bio-Rad, США) и ободования MagPix (Merk).

Результаты: по данным ОТ-ПЦР-РВ в лизатах ВФ детектируется мРНК ИФН α , β , γ (но не ИФН λ), а также ИЛ 6, ИЛ10 и ИЛ23, что подтверждается результатами мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа, показавшего наличие ИЛ2, 4, 8, 10, 12, 13, ИФН γ , G-CSF, MIP-1, MIP-1 β , но не ИЛ 1 β , ИЛ17A и TNF α . β Выявлена прямая корреляция экспрессии генов ИФН 1 типа (между мРНК ИФН α и ИФН β ($r=0,98$)). Общей тенденцией был сниженный на 10% уровень количества РНК цитокинов в ВФ из зоны затылка по сравнению с зоной темени, при этом достоверных различий между здоровыми людьми и пациентами не наблюдалось. По данным ИФА продукция ИЛ10 в ВФ здоровых добровольцев ($0,26 \pm 0,12$ пкг/ВФ) была выше, чем у пациентов ($0,08 \pm 0,03$ пкг/ВФ), $p < 0,05$. Выявлена отрицательная корреляция между

количествами мРНК ($r = -0,44$) и белков ИЛ6 и ИЛ10 ($r = -0,65$), возможно, в результате подавления секреции ИЛ6 регуляторным ИЛ10. **Заключение:** в фолликулах экстрагированных вручную волос человека в фазе анагена детектируется экспрессия генов цитокинов и их продукция в норме и при АГА. В ВФ человека методами ОТ-ПЦР-РВ, ИФА и xMAP показана экспрессия генов ИФН 1 и 2 типа, а также ряда ИЛ, среди которых регуляторный ИЛ10, по-видимому, может ингибировать секрецию ИЛ6. При низких уровнях продукции количества цитокинов не превышали содержания молекул мРНК.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-75-30064.

МЕТОД БИОМИМЕТИЧЕСКОГО ОСАЖДЕНИЯ ИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ НА ГРАНУЛЫ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Полина Викторовна Михеева, Анастасия Юрьевна Тетерина, Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

mikheevap7@gmail.com

Для заполнения широкого спектра костных дефектов разрабатывается множество различных материалов, которые должны иметь свойства, схожие с биогенными тканями организма. Для регенерации поврежденного участка важна биологическая совместимость материала, его соединительная активность, скорость резорбции, остеиндуктивные и остеокондуктивные свойства. Однако, при помещении в биогенную среду, необходимы улучшения биологических свойств материалов, минимизация рисков возможных осложнений и возможность создания биоинженерных конструкций с лечебными препаратами. Метод биомиметического осаждения из физиологических растворов подходит для этих целей по ряду причин: использование физиологической температуры для дальнейшего инкорпорирования биологических агентов, сохраняя их биологическую активность; возможность контроля pH и ионного состава используемых буферных систем, моделирующих межклеточные жидкости организма, и управления характеристиками материала.

Для исследования был выбран материал на основе октакальций фосфата (ОКФ)-прекурсора биологического гидроксиапатита, так как он был получен низкотемпературным способом, характеризуется высокой скоростью резорбции, близкой к образованию ткани de novo, повышенными остеиндуктивными и остеокондуктивными свойствами. В качестве буферных систем использовались supersaturated calcification solution (SCS) и simulated body fluid (SBF). Данные растворы обладают физиологическим значением pH, температуры, ионным составом и концентрацией, моделирующими межклеточные жидкости организма.

Целью исследования было установление влияния состава и концентрации данных буферных систем на изменение свойств, морфологии поверхностного слоя и состава гранул ОКФ, в зависимости от времени выдержки от 1 до 44 суток, для дальнейшего внедрения биологических факторов.

Гранулы ОКФ, размером от 1000 до 2000 мкм, получали методом химической трансформации. Растворы SCS и SBF готовили согласно литературе.

По результатам рентгенофазового анализа, инфракрасной спектроскопии, химического анализа и микроскопии установлены закономерности изменения соотношения фазового состава и морфологии поверхностного слоя гранул ОКФ во времени, а также влияние концентрации ионов кальция и фосфора на переосаждение материала. Раствор SCS обладает необходимыми характеристиками для дальнейшего изучения процесса биомиметического осаждения факторов роста на гранулы ОКФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-33-00955 мол_а).

ВЛИЯНИЕ ВИТРИФИКАЦИИ НА МОРФОЛОГИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ООЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Анастасия Сергеевна Миценюк,
Елена Вячеславовна Абакушина**

*Инженерно-физический институт биомедицины,
отделение биотехнологий, ИАТЭ НИЯУ МИФИ,
Обнинск, Россия*

micenyk-anastasi@mail.ru

Успех оплодотворения криоконсервированных ооцитов млекопитающих, в частности человека, во многом зависит как от используемых в средах криопротекторов, так и от выбранного способа заморозки. На сегодняшний день наиболее простым и эффективным методом криоконсервации ооцитов признан метод витрификации. И так как результаты получения эмбрионов *in vitro* и их последующей трансплантации напрямую зависят от качества размороженных яйцеклеток (ЯК) — изучение влияния витрификации на морфологию и жизнеспособность ооцитов млекопитающих актуально как для животноводства, так и для репродуктивной медицины.

В качестве модели использовались ооциты коров: из-за особенностей строения они наиболее близки по свойствам к человеческим. Это важно, особенно при переносе протокола витрификации с животной модели на ооциты человека. Витрификация осуществлялась путем последовательной инкубации ЯК, извлеченных из яичников 8 коров при помощи аспирации антральных и преовуляторных фолликулов, в средах с разной концентрацией DMSO и EG в несколько этапов с последующим замораживанием. После хранения в жидком азоте опытные образцы были разморожены в растворах сахарозы. Для оценки жизнеспособности ооцитов был проведен морфологический анализ и флуоресцентная микроскопия (красители — CAM и Hoechst).

В результате аспирации яичников было получено 97 яйцеклеток коров разной степени зрелости от GV до MIII. Для витрификации были отобраны ооциты, окруженные клетками кумулюса, хорошего качества. После длительного хранения (12 месяцев) было разморожено 46 ооцитов. Анализ морфологии ЯК после оттаивания с последующим включением флуоресцентного красителя CAM показал, что 38 из 46 (82.6%) ооцитов имели нормальную морфологию, а остальные 18,4% (8/46) имели дегенеративные структурные изменения. Ядра клеток кумулюса хорошо прокрасились Hoechst и визуализировались под флуоресцентным микроскопом.

Выводы. Таким образом, метод витрификации и разработанный в результате данного исследования протокол мгновенного замораживания могут быть успешно применены не только в сельском хозяйстве и животноводстве,

но и в репродуктивной медицине: перенос данной технологии витрификации с животной модели — с ооцитов коров — на замораживание ооцитов человека.

Эта работа была поддержана Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (грант № 14269ГУ/2019).

ИНТЕРЛЕЙКИН-4 РЕГУЛИРУЕТ ПОГЛОЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ, АКТИВАЦИЮ ИНСУЛИНОВОЙ И STAT6-ЗАВИСИМОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В АДИПОЦИТАХ ЗТЗ-L1

Светлана Сергеевна Мичурина^{1,2}, Юрий Сергеевич Стафеев¹, Ирина Борисовна Белоглазова¹, Юлия Дмитриевна Молокотина¹, Екатерина Сергеевна Зубкова¹, Евгений Константинович Шевченко¹, Александр Вячеславович Воротников^{1,2}, Михаил Юрьевич Меньшиков¹, Елена Викторовна Парфенова^{1,2}

*¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России,
Москва, Россия;*

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

svetlana_michurina@rambler.ru

Введение. Хроническое латентное воспаление в жировой ткани, возникающее при ожирении, является потенциальной причиной возникновения системной инсулиновой резистентности (ИР) и развития сахарного диабета 2 типа (СД2Т). Исследования показали, что противовоспалительный цитокин интерлейкин 4 (ИЛ-4) повышает чувствительность к инсулину в животных моделях СД2Т, а также регулирует накопление липидов за счет активации липолиза. В нашей работе мы исследуем возможные механизмы действия ИЛ-4 на углеводный обмен в адипоцитах и его влияние на чувствительность к инсулину в модели липид-индуцированного ИР.

Методы. Адипоциты ЗТЗ-L1 обрабатывали рекомбинантным ИЛ-4 (50 нг/мл) или трансдуцировали геном ИЛ-4. Затем зрелые адипоциты подвергали воздействию 1 mM пальмитата для индукции ИР и анализировали их чувствительность к инсулину по активации фосфорилирования IRS-1 (Y612), Akt (S473, T308), AS160 (S318) и по поглощению [³H]-2-дезоксиглюкозы ([³H]-2DG). Активация STAT6 определялась путем анализа фосфорилирования STAT6 (Y641) и ядерной транслокации, наблюдаемой при конфокальной микроскопии. Изменение экспрессии белков после обработки ИЛ-4 оценивали путем shotgun протеомного исследования с использованием системы ВЭЖХ-МС.

Результаты. Мы обнаружили увеличение базального и инсулин-зависимого поглощения [³H]-2DG как после воздействия рекомбинантного ИЛ-4, так и после лентивирусной трансдукции ИЛ-4. Кроме того, ИЛ-4 предотвращает снижение активации инсулиновой сигнализации в модели липид-индуцированной ИР.

При исследовании возможных механизмов действия ИЛ-4 мы наблюдали активацию фосфорилирования и ядерную транслокацию STAT6 в адипоцитах под действием цитокина. Протеомные данные показали, что ИЛ-4 регулирует метаболические процессы в адипоцитах (45 генов), в особенности, активирует митохондриальные белки (7 генов).

Выводы: ИЛ-4 улучшает чувствительность адипоцитов к инсулину в условиях гиперлипидемии. Мы предполагаем, что ИЛ-4 увеличивает базальную способность адипоцитов поглощать глюкозу через STAT6-зависимые механизмы и переключение метаболизма митохондрий.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТРАТА НА НЕЙРОНАЛЬНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SH-SY5Y

Анастасия Михайловна Мойсенович^{1,2}, Анастасия Юрьевна Архипова^{1,3}, Иван Викторович Бессонов⁴, Андрей Сергеевич Колосов¹, Виктор Вячеславович Татарский⁵⁻⁷, Константин Вольдемарович Шайтан¹, Михаил Михайлович Мойсенович¹

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия;

³ Научно-исследовательская лаборатория отдела экспериментальных и клинических исследований, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

⁴ АО «Эфферон», Москва, Россия;

⁵ Лаборатория механизмов гибели опухолевых клеток, Российский научный онкологический центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия;

⁶ Лаборатория молекулярной онкобиологии, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

⁷ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

a-moisenovich@mail.ru

Образование и восстановление нервной ткани требует точного контроля межклеточных и внутри клеточных дифференцировочных сигналов. Генерирование и передача таких сигналов обуславливаются как межклеточным взаимодействием и экспрессией растворимых факторов роста, так и свойствами внеклеточного матрикса (ВКМ). Механические свойства ВКМ, такие как жесткость, микроструктура и 2D/3D организация, оказывают значительное влияние на клеточную адгезию, пролиферацию, экспрессию белка, дифференцировку и другие функции клеток. Для исследования влияния изменения механических свойств субстрата на нейрональную дифференцировку была использована модель 12 дневной дифференцировки клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y в присутствии третионина и BDNF на тонких пленках, изготовленных из фиброина (ФБ) и его метакрилизованного производного (ФБМА). Материалы на основе ФБ обладают доказанной биосовместимостью, уникальными механическими характеристиками и возможностью их изменения. В результате введения в ФБ метакриловых групп по боковым аминокетам лизина и аргинина был получен фотоотверждаемый полимер, адаптированный для использования в фотолитографии и получения микроструктурированных конструкций. За счет наличия двойных ковалентных и физических типов сшивания жесткость ФБМА возрастала в 19 раз по сравнению с нативным ФБ, $480,1 \pm 8,9$ кПа и $25,2 \pm 3,7$ кПа, соответственно. Кроме того, ФБМА характеризовался более низким зарядом и контактным углом смачивания по сравнению с конструкциями из немодифицированного белка. При сравнении влияния пленок и ФБ и ФБМА на адгезию, распластывание и пролиферацию клеток SH-SY5Y было показано, что изменение механических свойств субстратов мало влияло на адгезию и пролиферацию клеток, при этом было отмечено

уменьшение скорости распластывания клеток на ФБМА, что можно объяснить его более высокой гидрофобностью, однако через 24 часа культивирования площадь клеток не отличалась на разных типах подложек. При культивировании клеток на ФБМА в дифференцировочных условиях было отмечено увеличение средней длины нейритов по сравнению с ФБ и «золотым стандартом» для культивирования нейрональных клеток — поли-L-лизин, $234,50 \pm 24,70$ μm , $207,50 \pm 35,11$ μm и $165,24$ μm , $14,91$ μm , соответственно. Таким образом повышение жесткости поверхности способствует увеличению роста нейритов, что является критически важным механизмом функционального восстановления как центральной, так и периферической нервной системы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ. Проект № 17-00-00359.

СОВМЕСТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ HGF И GDNF СТИМУЛИРУЕТ РОСТ НЕЙРИТОВ, УСИЛИВАЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ERK1/2

Юлия Дмитриевна Молокотина¹, Юрий Сергеевич Стафеев¹, Мария Александровна Болдырева¹, Екатерина Сергеевна Зубкова¹, Зоя Ивановна Цоколаева¹, Екатерина Владимировна Семина², Елена Викторовна Парфенова¹

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

yulia.molokotina@mail.ru

Несмотря на обширное разнообразие подходов, направленных на восстановление поврежденных периферических нервов, эффективность их лечения остается низкой, что приводит в половине случаев к инвалидности пациентов, среди которых преимущественно люди молодого трудоспособного возраста.

Регенерация периферического нерва — совокупность сложных многокомпонентных и взаимосвязанных процессов, контролируемых широким спектром биологически активных молекул. Однако, в случае тяжелого, обширного повреждения естественного регенеративного потенциала недостаточно, и для более полного восстановления необходимо дополнительное обеспечение факторами роста. Поскольку число одновременно используемых рекомбинантных факторов роста ограничено, успешный поиск наиболее эффективных их комбинаций создаст новые возможности в области нейрорегенерации.

Учитывая комплексность процессов восстановления нерва, перспективным представляется применение факторов роста, обладающих плеiotропными эффектами и воздействующих на множественные механизмы регенерации. Такими свойствами обладает фактор роста гепатоцитов (HGF), который сочетает ангиогенный, нейротропный, противовоспалительный и антифибротический эффекты.

В данной работе на модели эксплантов спинальных ганглиев мыши была исследована возможность стимуляции отрастания нейритов при воздействии HGF в комбинации с глиальным нейротрофическим фактором (GDNF), обладающим выраженными нейротропными свойствами. Анализ результатов показал, что добавление к среде культивирования комбинации мышечных рекомбинантных HGF и GDNF наиболее эффективно увеличивает количество отрастающих нейритов по сравнению

с контролем и добавлением того же количества рекомбинантных факторов в отдельности. Для выяснения механизма усиления отрастания нейритов было проведено исследование влияния факторов на фосфорилирование рецептора HGF c-met и активацию ERK1/2 киназ в клетках нейробластомы Neuro2A методом иммуноблоттинга. В результате, предполагаемым механизмом синергичного действия HGF и GDNF является усиление активации митогенного сигнального каскада, опосредуемого протеинкиназами ERK1/2, в результате трансактивации рецептора c-met в присутствии комбинации факторов.

Использование комбинации HGF и GDNF может лечь в основу разработки эффективных методов восстановления функции периферического нерва, нарушенной в результате травматического и ишемического повреждения.

Работа поддержана грантом грант РФФИ № 18-015-00430.

РАЗРАБОТКА ЭЛАСТИНОВЫХ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ БИОСОВМЕСТИМОСТИ IN VITRO

Анастасия Дмитриевна Монакова^{1,2}, Анастасия Евгеньевна Бодягина³, Аида Фазилевна Муляр³, Алена Игоревна Звягина¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

² ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

monakova_ad@mail.ru

Использование барьерных мембран (БМ) для направленной регенерации тканей в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является доминирующим. Однако данный тип материалов до сих пор не способен обеспечить все необходимые условия для полноценного восстановления дефектов, в связи с чем некоторые процедуры, такие как, например, аугментация десневого лоскута, до сих пор трудноосуществимы. Одним из возможных вариантов решения данной проблемы может стать разработка биоактивных БМ на основе эластинового внеклеточного матрикса.

Целью данной работы стало исследование и сравнение эффективности двух различных методов выделения эластина из ксеногенной аорты с целью их дальнейшей оптимизации для изготовления эластиновых БМ. Для этого были отобраны методы, которые позволяют выделить эластиновый компонент внеклеточного матрикса, при условии максимального сохранения структуры эластиновых фибрилл. На основе полученных материалов были сформированы 2 экспериментальные группы: материалы, обработанные цианогенбромидом (Lu Q. et al, Biomaterials. 2004), далее группа ЦГБр; и с помощью автоклавирования — группа АВТ (Lillie M.A. et al, Connect Tissue Res. 1998). Для определения эффективности отобранных методов было проведено *in vitro* исследование цитотоксичности, а также измерение остаточного ДНК донора в полученных материалах.

Анализ эффективности удаления ДНК показал, что обработка автоклавированием приводит к удалению $69 \pm 11\%$ ДНК донора. Однако среднее значение ДНК в данных материалах все еще превышало максимально допустимое значение в 50 нг/мг ткани. Обработка цианогенбромидом

показала большую эффективность: количество ДНК донора в ткани после обработки составляло $10,6 \pm 2,2$ нг/мг ткани. Однако *in vitro* исследование цитотоксичности показало, что материалы группы ЦГБр токсичны для клеток, так как процент погибших клеток на четвертые сутки инкубации составил $74 \pm 6\%$ относительно контроля. В то время как в группе АВТ цитотоксический эффект не наблюдался: выживаемость клеток составила $87 \pm 4\%$.

Полученные результаты говорят о том, что обработка цианогенбромидом не подходит для получения эластиновых БМ, поскольку оказывает цитотоксический эффект на клетки. Обработка автоклавированием является более оптимальной, однако требует дополнительной модификации, поскольку недостаточно хорошо удаляет ДНК из донорской ткани.

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН при финансовой поддержке Фонда действия инновациям.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ

Ирина Юрьевна Морина, Елена Викторовна Михайлова, Ирина Владимировна Романова

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

irinamorina@mail.ru

Орексины (А и В) или гипокритины — пептиды, которые образуются в нейронах периферической области гипоталамуса в результате ферментативного расщепления молекулы-предшественника — препро-орексина (Sakurai, 1998; de Lecea, et al., 1998). Первоначально функциональное значение орексинов связывали с регуляцией пищевого поведения и энергетического баланса, бодрствования и пробуждения. В настоящее время показано участие этих пептидов в контроле и других функций мозга, а также широко обсуждается роль орексинов в эмбриогенезе как факторов морфогенеза (Ito et al., 2008; Bjornstrom, et al., 2014; Bakos, et al., 2016).

Цель исследования: оценить иммунореактивность орексина в гипоталамической области рядом с зоной ишемического поражения, которая была определена с помощью МРТ, на третьи сутки после 45 мин. окклюзии сонной артерии у крыс линии Вистар (Shevtsov M.A. et al., 2014; n=5) и после ишемии-реперфузии (n=4).

Использованы методы иммуногистохимии (методика с использованием биотин-стрептавидин-диаминобензидина). На фронтальных срезах мозга крысы, изготовленных с помощью криостата, проведено иммуногистохимическое исследование с помощью антител мыши против орексина-А (R&Dsystems) и вторичных антител козы против мыши, конъюгированных с биотином (VectorLabs.). На микрофотографиях, полученных с помощью микроскопа Carl Zeiss, проведен количественный анализ иммунопозитивного орексина-А в нейронах и в отростках. После фокальной ишемии рядом с областью поражения выявлено увеличение уровня орексина-А в нейронах (в 2 раза, $p < 0,05$), а также в отростках, локализованных в преоптической области со стороны поражения, непосредственно вокруг пораженного участка коры больших полушарий, а также в области гиппокампа по сравнению с ложнопериоперированными крысами. После ишемии-реперфузии также отмечено

увеличение оптической плотности орексина-А в телах нейронов, локализованных в гипоталамусе, а также и в их отростках, локализованных в различных отделах мозга по сравнению с ложнооперированными животными. Полученные результаты указывают на возможное участие орексинов в процессах репарации, что, очевидно, является проявлением его морфогенетической функции, которая реализуется как в раннем онтогенезе, так и при патологии.

Работа поддержана госзаданием ФАНО (№ АААА-А18-118012290427-7).

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАТА ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ОЦЕНКА АКТИВАЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ fMPT У БОЛЬНЫХ ПРОСТОЙ ФОРМОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ С ЯВЛЕНИЯМИ АСТЕНИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА В СОСТОЯНИИ РЕМИССИИ

Яна Вячеславовна Морозова¹, Дмитрий Владимирович Устюжанин¹, Мераб Арчилович Шария¹, Анатолий Болеславович Смулевич², Владимир Николаевич Смирнов¹

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научный Центр Психического Здоровья», Москва, Россия

d-ust@yandex.ru

Астения у больных шизофренией значительно снижает адаптационные возможности больных, препятствует нормальному социальному и профессиональному функционированию, присутствуя как в период манифестации заболевания, так и на более поздних этапах течения, в ремиссии и резидуальных состояниях.

Исследование включало 15 мужчин, больных шизофренией с явлениями астении в состоянии ремиссии (простая F20.6 или бедная симптомами F21.5 шизофрения по МКБ-10).

Клетки пуповинной крови (КПК) вводились в дозе 250 млн. Введение препаратов проводилось 4-кратно, с интервалами в 14 дней.

Целью исследования являлась оценка безопасности и эффективности клеток пуповинной крови в коррекции шизоастении и коморбидных негативных расстройств.

Исследовался криоконсервированный концентрат ядродержащих клеток пуповинной крови человека.

Оценка эффективности и безопасности (методы):

1. психопатологический; 2. психометрический: шкала позитивных и негативных симптомов шизофрении (PANSS), Шкала общего клинического впечатления (CGI), шкала астении MFI-20; 3. патопсихологический: когнитивная батарея (МССВ), шкала депрессии Бека; 4. клиническая оценка нежелательных явлений (побочных эффектов); 5. Функциональной визуализации (fMPT).

На данном этапе, проводимое исследование позволило установить, что введение КПК оказывает положительное воздействие на обусловленные психопатологическим процессом расстройства астенического круга при шизофрении, включая как снижение уровня активности, так и явления психической астении в виде нарушения когнитивного функционирования и тем самым способствует коррекции явлений терапевтической резистентности. При этом положительный эффект изученного метода аугментивной терапии не сопровождается нежелательными явлениями.

По результатам функциональной МРТ на фоне лечения выявлена перестройка коры мозга с достоверным изменением зон активации и дезактивации в ответ на задание «выполнение счета от 100 по 7». Изменение активации некоторых из областей имело значимую корреляцию с динамикой клинической картины, по шкале оценки PANSS и когнитивной батарее МССВ.

По-видимому, клетки пуповинной крови потенцируют механизмы действия традиционных и атипичных антипсихотиков, тем самым оказывая наблюдаемое нейромодулирующее действие в фармакологическом эффекте психотропных препаратов. В качестве научной гипотезы результаты проведенной терапии можно интерпретировать как следствие активации нейрогенеза у взрослого человека, что является нехарактерным для типично наблюдаемого течения заболевания.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ МЫШИ НА РОСТ ОПУХОЛЕЙ

Елизавета Юрьевна Москалева¹, Елена Соломоновна Жорова², Юлия Павловна Семочкина¹, Валентина Георгиевна Шуватова¹, Алла Валерьевна Родина¹, Владимир Павлович Сапрыкин³

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия;

² ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия;

³ Московский государственный областной университет, Мытищи, Россия

moskalevaey@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в процессах регенерации. Их использование перспективно при различных повреждениях, в том числе, вызванных лучевой терапией. Однако ранее было показано, что контрольные и облученные МСК из жировой ткани (ЖТ), но не из костного мозга (КМ), могут стимулировать рост опухолей и для определения условий безопасного использования этих клеток актуально изучение механизмов влияния МСК, в том числе облученных, на рост опухолей. Ускорение роста опухолей может определяться как стимулирующим действием секрета МСК, так и возможной пролиферацией МСК в составе опухоли. В связи с этим целью работы явилось изучение уровня секреции ряда цитокинов интактными и облученными МСК из КМ и ЖТ мыши и влияния МСК на строение аденокарциномы молочной железы линии Ca755 при совместном введении мышам МСК и опухолевых клеток.

МСК выделяли из КМ и ЖТ мышей линии C57BL/6, культивировали, характеризовали, облучали (⁶⁰Co) и вводили с опухолевыми клетками Ca755 (1:1) в соответствии с общепринятыми протоколами, как описано ранее (Москалева и др., 2019). Смесь клеток Ca755 и МСК вводили мышам подкожно по 1×10⁶ клеток в 100 мкл культуральной среды без сыворотки. Анализировали динамику роста, вес и клеточный состав опухолей. Уровень цитокинов IL6, HGF, VEGF и TGFβ в кондиционированной среде МСК определяли с помощью ИФА. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

Показано, что опухоли, возникшие у мышей в результате введения клеток Ca755, характеризовались вариабельностью строения. Очаги опухолевых клеток были окружены рыхлой соединительной тканью с небольшим количеством клеточных элементов. Клеточный состав опухолей, развившихся после введения клеток

Ca755 и смеси клеток Ca755 и контрольных и облученных МСК КМ и МСК ЖТ соответствовал аденокарциноме молочной железы. Наряду с эпителиальными аденоматозными структурами во всех опухолях также были представлены компоненты с мезенхимной дифференцировкой: хондронидной, остеоидной и миоидной, но очаги роста мезенхимных клеток отсутствовали. Появление мезенхимных элементов в опухолях только из клеток Ca755 по-видимому обусловлено миграцией МСК из КМ мыши. У МСК ЖТ обнаружен высокий уровень секреции цитокинов VEGF, IL6, HGF, и TGF β . Таким образом, стимуляция роста опухоли Ca755 МСК определяется действием секретируемых ими цитокинов, а разрастание введенных МСК в опухоли отсутствует.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Куратовский институт» (приказ № 1363 от 25.06.2019 г.)

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУРАХ

Екатерина Александровна Назарова, Светлана Ивановна Кривенко, Екатерина Геннадьевна Петровская, Евгения Алексеевна Примакова, Алла Александровна Сыманович

ГУ «Минский НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Беларусь

k.nazarova-86@mail.ru

Введение. Введение островков Лангерганса (ОЛ) является терапевтическим вариантом при состояниях, связанных с потерей функции β -клеток поджелудочной железы. Однако, подготовка эффективного транспланта ОЛ ассоциирована с их повреждением на различных этапах выделения, а также в момент и после введения реципиенту. Одной из главных причин гибели ОЛ во время введения реципиенту является воспалительная реакция. Новым способом защиты ОЛ после введения реципиенту могут служить мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Основная часть. В результате анализа данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии, о субпопуляционном составе лимфоцитов (однотипных и инотипных в системе АВО) в совместных культурах с ОЛ и МСК ($n=18$) установлено, что ОЛ проявляют антигенные свойства, что выражается увеличением относительного количества Т-регуляторов в совместных культурах ОЛ с инотипными лимфоцитами (5,10 [4,00; 7,90] %) по сравнению с таковым в монокультуре лимфоцитов (3,10 [2,20; 6,90] %) ($p=0,034$ в тесте Манна-Уитни) и цитотоксических терминально дифференцированных Т-лимфоцитов (TEMRA) в культуре ОЛ с инотипными лимфоцитами (1,20 [0,60; 7,50] %) по сравнению с таковым в монокультуре инотипных лимфоцитов (0,60 [0,50; 2,30] %) ($p=0,07$ в тесте Манна-Уитни). На другие субпопуляции Т-лимфоцитов присутствие ОЛ влияния не оказывало.

Присутствие МСК в совместных культурах с однотипными и инотипными лимфоцитами способствовало увеличению относительного количества В-лимфоцитов (7,00 [4,90; 11,20] % и 5,80 [3,80; 16,00] %) по сравнению с количеством в монокультурах лимфоцитов (5,20 [2,80; 8,40] % 4,30 [2,10; 12,00] %) ($p=0,008$ и $p=0,042$ соответственно, тест Манна-Уитни), а в совместных культурах с инотипными лимфоцитами ещё и увеличению относительного количества

Т-регуляторов (6,00 [4,20; 9,00] %) по сравнению с таковым в монокультуре лимфоцитов (3,10 [2,20; 6,90] %) ($p=0,034$, тест Манна-Уитни).

Заключение. Островки Лангерганса в совместных культурах с инотипными лимфоцитами способны активировать Т-клеточный иммунитет за счёт увеличения относительного количества Т-регуляторов и TEMRA.

МСК *in vitro* способны корректировать выраженность иммунного ответа, вызванного донорскими ОЛ независимо от групповой принадлежности в системе АВО, за счёт увеличения Т-регуляторов и ингибирования активации Т-эффекторных клеток, способствуя развитию трансплантационной толерантности.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ, ПОСЛЕ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРЫСАМ С МОДЕЛЬЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МОЗГА

Дарья Дмитриевна Наместникова¹, Илья Леонидович Губский³, Вероника Александровна Ревкова⁶, Кирилл Константинович Сухинич⁴, Павел Александрович Мельников⁷, Диана Ирековна Салихова⁵, Георгий Евгеньевич Леонов⁵, Эльвира Андреевна Черкашова³, Анна Николаевна Габашвили¹, Вероника Вячеславовна Бурунова², Игорь Викторович Вахрушев², Татьяна Борисовна Бухарова⁵, Дмитрий Вадимович Гольштейн⁵, Леонид Васильевич Губский^{1,3}, Владими Павлович Баклаушев⁶, Константин Никитич Ярыгин²

¹ *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;*

² *Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, Россия;*

³ *Федеральный центр cerebrovasкулярной патологии и инсульта Минздрава России, Москва, Россия;*

⁴ *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;*

⁵ *Медико-Генетический Научный Центр, Москва, Россия;*

⁶ *Федеральный научно-клинический центр ФМБА Российской Федерации, Москва, Россия;*

⁷ *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва, Россия*

dadnam89@gmail.com

Трансплантация различных типов стволовых клеток (СК) показала терапевтическую эффективность как на моделях экспериментальной ишемии головного мозга у животных, так и у пациентов с ишемическим инсультом во время клинических испытаний. В нашей работе был проведен сравнительный анализ биораспределения и эффективности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и нейральных прогениторных клеток (НПК), полученных из разных источников, после внутриартериального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга.

Самцам крыс линии Вистар была произведена транзиторная окклюзия средней мозговой артерии 90 мин., после чего через 24ч в ипсилатеральную внутреннюю

сонную артерию при помощи инфузомата со скоростью 100 мкл./мин с поддержанием кровотока вокруг катетера вводили 1 мл физиологического раствора или различные типы СК человека (5×10^5 в 1 мл): МСК, выделенные из плаценты (пМСК) или дентальной пульпы молочных зубов (дМСК), нейральные прогениторные клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных клеток (иНПК) или полученные методом прямого репрограммирования из МСК костного мозга с помощью транскрипционных факторов MSI1, NGN2, MBD2 (рНПК, drNPC). Для оценки терапевтического эффекта оценивался неврологический дефицит животных, выживаемость, выполнялись МРТ и иммуногистохимическое исследование головного мозга в динамике в течение 14 суток. Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены локальным этическим комитетом и проведены в соответствии с международным регламентом.

Трансплантация всех изученных типов СК уже на 7 сутки после введения вызывала статистически достоверное более быстрое функциональное восстановление после инсульта экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой. Однако трансплантация только иНПК и рНПК ускоряла уменьшения очага инфаркта мозга. После внутриартериального введения все типы трансплантированных СК распределялись в полушарии введения преимущественно по периферии очага инфаркта, а также в области ствола мозга. Клетки визуализировались внутри сосудов в плотном контакте с внутренней частью их стенки. пМСК оставались в веществе головного мозга до 3–4 дней, что дольше, чем у других типов клеток. Наши результаты указывают на различный характер хоуминга и потенциальных механизмов терапевтического действия разных типов стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184).

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОМПОЗИТНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛИЕВОЙ КИСЛОТ, ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Юлия Александровна Нащекина^{1,3}, Светлана Алексеевна Александрова¹, Сергей Викторович Надеждин², Любовь Анатольевна Покровская³, Наталья Аркадьевна Михайлова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Белгородский национальный исследовательский университет, Белгород, Россия;

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

ulychka@mail.ru

Актуальность. Перспективным направлением современной регенеративной медицины костной ткани является трансплантация тканеинженерных конструкций на основе полимерных скаффолдов и стволовых клеток. Однако большинство материалов по структуре и свойствам уступают нативной костной ткани, а это существенно снижает регенеративный потенциал трансплантируемых клеток. Создание биodeградируемых, скаффолдов, обладающих остеоиндуктивными свойствами, позволит клеткам *in vitro* сформировать структуры, максимально идентичные нативной костной ткани. Перспективными материалами для формирования таких скаффолдов являются

композиты на основе биodeградируемых сополимеров молочной и гликолиевой кислот (PLGA) вместе с гидроксипатитом (ГА). Но структура и свойства гидроксипатита отличаются от фосфатов кальция нативной костной ткани. Приблизёнными по своим свойствам к нативной костной ткани являются кристаллы ГА, у которых содержание фазы β — трикальций фосфата (β — ТКФ) не менее 90%.

Цель: формирование композитных скаффолдов на основе (PLGA), с добавлением смеси ГА и β — ТКФ, и последующая оценка остеоиндуктивных свойств разработанных скаффолдов на мезенхимных стволовых клетках человека (МСК).

Материалы и методы: PLGA синтезировали полимеризацией с раскрытием цикла, β -ТКФ/ГА получали методом гидротермального синтеза. Все составляющие были охарактеризованы методами физико-химического анализа. Были сформированы композитные скаффолды с содержанием неорганической фазы 50%. Способность к адгезии, пролиферации и остеогенной дифференцировке была протестирована на линии нетрансформированных МСК.

Результаты: в процессе выполнения работы были получены пористые скаффолды с развитой структурой и равномерно распределёнными частицами β -ТКФ по всему объёму скаффолда. Сформированные скаффолды не оказывали токсического влияния на культивируемые клетки в течение 28 суток культивирования. Было продемонстрировано, что β -ТКФ не только способствует адгезии и пролиферации клеток, но и накоплению кальция, свидетельствующего о дифференцировке клеток в остеогенном направлении после 14 суток культивирования. Показано, что присутствие β -ТКФ усиливает остеогенный потенциал разрабатываемой конструкции.

Выводы: полученные тканеинженерные композиты могут быть в перспективе использованы для реконструкции повреждённой костной ткани различной степени тяжести.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

МАКРОФАГИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТКАНЕВЫХ РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ

Татьяна Анатольевна Ненашева^{1,2}, Яна Викторовна Сердюк^{1,2}, Татьяна Павловна Герасимова¹, Александр Александрович Николаев², Елена Викторовна Григорьева³, Ирина Владимировна Лядова^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия;

³ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

ivlyadova@mail.ru

Макрофаги (Мф) являются важным звеном клеточно-иммунитета, играют существенную роль в поддержании гомеостаза, развитии и регуляции иммунного ответа и воспаления. Нарушения функции Мф лежат в основе патогенеза многих заболеваний, в связи с чем изучение механизмов их функционирования, моделирование

их взаимодействия с патогеном и разработка методов таргетной регуляции их активности представляют значительный интерес. Одним из существенных ограничений для решения этих задач является отсутствие адекватных моделей генерации тканевых резидентных Мф человека.

Целью настоящей работы явилась отработка методов получения Мф из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека, их характеристика и использование для создания модели взаимодействия Мф:патоген.

Мф получали из иПСК путем генерации эмбриональных телес (ЭТ) и различных методов их дифференцировки: (i) «прямой» дифференцировки ЭТ в моноцитоподобные клетки, основанной на одновременном добавлении в культуры цитокинов, стимулирующих образование гемопоэтических клеток и моноцитов (IL-3, M-CSF); (ii) «поэтапной» дифференцировки ЭТ, основанной на последовательной смене набора ростовых факторов и цитокинов, стимулирующих генерацию гемопоэтических клеток и моноцитов (BMP-4, bFGF, IL-3, IL-6, M-CSF и др.). Дифференцировку моноцитоподобных клеток в Мф проводили, культивируя клетки в присутствии M-CSF.

Использование обоих методов обеспечивало получение крупных (более 20 мкм) высоковакуолизованных клеток, экспрессирующих фенотип Мф: CD45⁺CD14⁺CD11b⁺ (иМф). иМф отличались от моноцитов крови и Мф, полученных из моноцитов крови, по экспрессии HLA-DR, CD16, CD80, CD86 и были сходными с Мф, выделенными из ткани легкого, по экспрессии CD16, CD206. иМф отвечали на провоспалительные стимулы секрецией провоспалительных цитокинов, обладали фагоцитарной и антибактериальной активностью. Отработаны условия со-культивирования иМф с внутриклеточными бактериями (*Mycobacterium tuberculosis*), позволяющие моделировать взаимодействия макрофаг:патоген.

Таким образом, отработаны методы генерации функционально активных Мф, созданы клеточная модель для изучения взаимодействия макрофаг:патоген, методическая основа для получения генетически модифицированных макрофагов.

Работа выполнена при поддержке Программы РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (отработка метода «прямой» дифференцировки иМф) и гранта РФФИ № 19-75-20176 (метод «поэтапной» дифференцировки, фенотипическая и функциональная характеристика иМф).

ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

Ольга Андреевна Неустроева, Александр Маазович Аймалетдинов, Сирина Василевна Курбангалеева, Альберт Анатольевич Ризванов, Марина Олеговна Гомзикова

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

neustroeva.olga@mail.ru

Естественные микровезикулы (МВ) мезенхимных стволовых клеток (МСК) проявляют биологические свойства характерные родительским клеткам. В контексте развития иммунного ответа МВ МСК проявляют иммуносупрессивные свойства. Благодаря своему размеру (50–2000 нм) МВ МСК наиболее предпочтительные кандидаты на роль терапевтического средства, чем МСК,

так как исключают риск эмболии. Однако, в настоящее время количество естественных МВ МСК, получаемое из кондиционированных сред является недостаточным для использования в терапии. В связи с актуальностью данного вопроса мы исследовали изменения в развитии клеточного иммунного ответа под действием внутривенной инъекции (в.в.) аллогенных индуцированных цитохлазином В МВ (МВ-ЦВ) МСК.

Нами было установлено, что на мембране МСК и искусственных МВ-ЦВ МСК мышей экспрессируются специфические поверхностные маркеры CD90.2⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD49e⁺, Sca1⁺, CD29⁺. При помощи сканирующей электронной микроскопии был определён размер МВ-ЦВ, который составил от 100 до 1300 нм. Влияние внутривенной (в.в.) инъекции аллогенных МСК и МВ-ЦВ на гематолимфоидные ткани оценивали путём подсчета лейкоцитов в селезенке, тимусе и костном мозге мышей. Общее количество лейкоцитов (ОКЛ) в селезенке мышей, предварительно получивших в.в. инъекцию МСК или МВ-ЦВ, было ниже в 1,3 (p = 0,11) и в 1,4 раза (p = 0,13), соответственно, чем у контрольных животных (инъекцированных физиологическим раствором). В.в. инъекция МСК привела к снижению ОКЛ в тимусе мышей в 1,6 раз (p = 0,11), а инъекция МВ-ЦВ привела к снижению ОКЛ в 1,5 раза (p = 0,4). Аналогично, ОКЛ в костном мозге мышей, обработанных МСК или МВ-ЦВ было ниже, чем у контрольной группы в 1,2 (p = 0,88) и 1,3 раза (p = 0,23), соответственно. Далее анализировали влияние МВ-ЦВ на жизнеспособность лейкоцитов, выделенных из вышеуказанных органов иммунной системы мышей. Процент жизнеспособных клеток, обработанных МВ-ЦВ или физиологическим раствором составил: в селезенке — 95,5 ± 3,5% и 94,8 ± 4%, тимусе — 76,0 ± 2,0% и 78,7 ± 4,4%, костном мозге — 78,2 ± 3% и 76,9 ± 1,4%, соответственно.

Таким образом, мы обнаружили, что МВ-ЦВ МСК не влияют на жизнеспособность лейкоцитов селезенки, тимуса и костного мозга. Полученные данные позволяют предположить, что МВ-ЦВ МСК проявляют иммуносупрессивные свойства, ингибируя пролиферацию и/или дифференцировку иммунных клеток.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-75-00090.

НОВЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РЕГИСТРАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ И ФАГОЦИТОЗА ПЛАНАРИЙ

Светлана Евгеньевна Нефедова^{1,2}, Кирилл Николаевич Новиков³, Александр Николаевич Великанов³, Харлампий Пантелеевич Тирас^{1,2}

¹ Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

³ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

nefedova-s.e.lady@ya.ru

Плоские черви планарии — уникальный объект, так как их базовые физиологические процессы происходят путем морфогенеза. Работа посвящена разработке пакета биофизических методов неинвазивного контроля основных клеточных процессов у планарий — фагоцитоза и регенерации. Регенерация у планарий протекает двумя параллельными путями: фагоцитоз поврежденных клеток и пролиферация стволовых клеток — необластов. В то же время фагоцитоз, протекающий на клеточном

уровне, — основной механизм переваривания пищи планарий. В связи с этим интерес вызывает возможность контроля клеточных физиологических процессов у планарий в ходе регенерации и пищеварения биофизическими неинвазивными методами путем регистрации сверхслабой фотонной эмиссии (ССФЭ) и динамической морфо- и цветометрии.

Регистрация ССФЭ проводилась хемилюминометром «Биотокс-7А» 2М, оснащенного фотоумножителем 9750QB/1 (область спектральной чувствительности 380–710 нм). Уровень ССФЭ в процессе фагоцитоза резко повышался через 24 часа после кормления, на 3 сутки достигал максимума, а к 5 дню возвращался к контрольному уровню. При регенерации максимальный уровень ССФЭ наблюдался также через 24 часа после перерезки, но с меньшей амплитудой, чем при фагоцитозе.

Морфоконтроль регенерации и фагоцитоза проводится методом прижизненной цифровой морфометрии (ПЦМ), включающей регистрацию размерных и цветовых характеристик животных. Для создания цифровых изображений планарий применялся цифровой микроскоп Stemi 2000C (Zeiss). Размерные показатели планарий регистрировали с использованием программы Plana 5.0. В процессе переваривания пищи планарии после кормления резко увеличивались в размерах, а к 3 дню площадь их тела постепенно уменьшалась до исходных значений. При регенерации соотношение площади тела регенеранта и бластемы восстанавливалось до величины, характерной для не поврежденных животных, в основном к 7 дню наблюдений.

Метод биологической цифровой цветометрии. Для регистрации цветовых характеристик тела животных использована программа Photoshop, позволяющая дать цифровую оценку цвета. Анализировали: тон цвета объекта, его теплоту, а также яркость и насыщенность. Выявлена тонкая динамика цветовых характеристик поверхности тела животных, отражающая динамику процессов, протекающих *in vivo* в процессе фагоцитоза и регенерации, и коррелирующая с динамикой размерных характеристик и уровня ССФЭ.

Полученные данные подтверждают возможность неинвазивного контроля основных клеточных процессов на модели плоских червей планарий.

СИНЦИТИОТРОФБЛАСТ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИСТОЧНИК ПОВЫШЕНИЯ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА И АНГИОТЕНЗИНА II В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН, СТРАДАЮЩИХ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Наталья Викторовна Низяева¹, Масара Денилбековна Гапаева¹, Наталья Анатольевна Ломова¹, Татьяна Юрьевна Иванец¹, Галина Владимировна Хлестова¹, Олег Радомирович Баев^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Niziaeva@gmail.com

Ведущим симптомом при преэклампсии (ПЭ) является повышение артериального давления. Одной из основных систем, участвующих в регуляции артериального

давления явления является ренин-ангиотензиновая система. Известно, что ангиотензиноген, из которого образуется вазоконстриктор ангиотензин II, синтезируется в печени. Известно, что во время беременности и особенно при ПЭ уровень в плазме крови ангиотензиногена повышен, однако причина этого не ясна. Были предположения, что ангиотензиноген может образовываться в трофобласте ворсин плаценты. Цель исследования: изучить экспрессию ангиотензиногена в ткани плаценты при ПЭ. В основу работы положен анализ уровня ангиотензиногена в образцах плаценты, полученной от 59 беременных, репродуктивного возраста, 32–39 недель гестации, из которых у 29 пациенток диагностирована ПЭ и 30 родильниц было с физиологическим течением беременности. На парафиновых срезах толщиной 4 мкм было проведено гистологическое (окрашивание гематоксилином и эозином) и иммуногистохимическое исследование с применением первичных антител к ангиотензиногену (Abcam). Критерии включения пациенток в группу с ПЭ: повышение артериального давления выше 140/90 мм. рт. ст. и протеинурия более 0,3 г в сутки. При анализе препаратов, окрашенных с антителами к ангиотензиногену было установлено интенсивное окрашивание синцитиотрофблеста (СЦТ) и синцитиальных почек, которое было более выраженным при преэклампсии, чем умеренное окрашивание в контрольной группе. Кроме того, в образцах плаценты при ПЭ имели место выраженные дистрофические изменения, местами СЦТ был поврежден и слущен с поверхности ворсин. Фрагменты поврежденного СЦТ, попадая в кровоток матери, могут быть одной из причин повышения ангиотензиногена в плазме крови во время беременности и причиной развития гипертензии. Ранее нами было проведено исследование концентрации ангиотензина в плазме крови методом Elisa и установлено, что уровень ангиотензина II при тяжелой ПЭ составил $24,0 \pm 5,0$ пг/мл и был значимо выше, чем при умеренной ПЭ ($15,3 \pm 1,2$ пг/мл), ($p=0,046$) и при несложненной беременности ($14,7 \pm 1,9$ пг/мл; $p=0,023$) ($p>0,05$). Таким образом, повышение ангиотензиногена в структурах плаценты, прежде всего, в синцитиотрофобласте может иметь важное значение в генезе преэклампсии.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-4566.2018.7. Договор № 075-02-2018-519.

ПОВЫШЕНИЕ АНГИОГЕНЕЗА КАК ФАКТОРА, СПОСОБСТВУЮЩЕГО РАЗРЫВУ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ

Наталья Викторовна Низяева¹, Анна Овиковна Карапетян¹, Масара Денилбековна Гапаева¹, Андрей Михайлович Приходько¹, Вероника Алексеевна Сеницына¹, Олег Радомирович Баев^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Niziaeva@gmail.com

Преждевременные роды (ПР) представляют собой полиэтиологическую группу. Наиболее изученной причиной ПР является преждевременный разрыв плодных

оболочек, связанные с микробными агентами, в остальных случаях причина ПР остается неизвестной. Кроме того, родовая деятельность регулируется окситоцином, вырабатываемым гипофизом, а также возможно структурами плаценты.

Цель исследования: изучить структурные изменения плодных оболочек при ПР в отсутствии их воспалительных изменений.

Материалы и методы. Проанализированы плодные оболочки от 25 последов: 14 – от спонтанных преждевременных родов в 28–36 недель, 7 – от самопроизвольных родов при доношенной неосложненной беременности; 4 – от преждевременных оперативных родов по поводу гипоксии плода, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, нарушения функционального состояния плода (на сроках гестации 27–32 недели). Выполнено гистологическое (гематоксилин и эозин), иммуногистохимическое исследование на парафиновых срезах плодных оболочек с использованием первичных антител к маркеру мезенхимных клеток виментину (Spring bioscience), маркеру ангиогенеза CD34 (Spring bioscience), маркеру макрофагов CD68 (Spring bioscience), а также к окситоцину (Abcam).

В результате исследования при окрашивании с антителами к CD34, CD68, виментину, выявлено окрашивание мезенхимных клеток и их отростков, образующих капиллярноподобные структуры, а также отмечены макрофаги, расположенные в центре указанных структур. По строению данные структуры сходны с так называемыми «стромальными каналами», являющимися проявлением раннего ангиогенеза ворсинчатого дерева плаценты. Установлено ослабление механической прочности плодных оболочек при ПР за счёт усиления ангиогенеза в компактном слое и децидуальной пластинке, и появление в этих структурах множественных дефектов и микро-разрывов. Наиболее высокая экспрессия отмечалась в образцах плодных оболочек при своевременных самопроизвольных родах и при ПР в цитотрофобласте и в децидуальных клетках. Последние непосредственно контактируют с полостью матки, что может явиться важным источником для инициации родовой деятельности.

Заключение. Таким образом, ПР обусловлены сочетанием определенных факторов: снижением механической прочности плодных оболочек, повышением ангиогенеза компактного слоя, множественными микродефектами и разрывами, что снижает механическую прочность плодных оболочек, а также синтез окситоцина структурами плодных оболочек вероятно способствует сокращению матки.

CD68⁺ КЛЕТКИ В ТКАНЯХ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Наталья Викторовна Низяева, Римма Алексеевна Полтавцева, Вероника Алексеевна Сеницына, Ина Георгиевна Панова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Niziaeva@gmail.com

Введение. CD68 (лизосомальный антиген) – гликопротеин из семейства LAMP. Экспрессируется на моноцитах крови, тканевых макрофагах, некоторых дендритных клетках, лимфоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках, клетках микроглии и используется в качестве

маркера этих клеток. В глазах взрослого человека были показаны CD 68⁺ клетки, принадлежащие к линии макрофаги/микроглия. Было также показано, что гиалоциты стекловидного тела, принадлежащие линии моноциты-макрофаги, не экспрессируют CD 68. В раннем пренатальном развитии глаза человека распределение CD 68⁺ клеток практически не исследовали.

Цель: проанализировать ткани глаза плодов человека на присутствие в них CD 68⁺ клеток.

Материал и методы. Исследовали абортивные глаза плодов человека на 9 и 13 нед. гестации и 19 нед. глаза, взятые на аутопсии по медицинским показаниям. Глазные яблоки фиксировали в 10% формалине, готовили гистологические срезы для иммунохимического пероксидазного окрашивания с применением моноклональных антител к CD68. Продукт реакции визуализировался в виде коричневого окрашивания.

Результаты. На 9, 13 и 19 нед. гестации CD 68⁺ клетки обнаружены в склере, в сосудистой оболочке, в стекловидном теле вблизи гиалоидных сосудов, а также единичные клетки в стекловидном теле вблизи внутренней пограничной мембраны. В склере CD 68⁺ клетки распределены в виде отдельных клеток, а также вокруг формирующихся кровеносных сосудов. На 13 и 19 нед. гестации CD 68⁺ клетки обнаруживаются в строме цилиарного тела и единичные клетки между складками цилиарных отростков, в передней камере, а также в строме роговицы. На 13 нед в сетчатке была замечена одна CD 68⁺ клетка, что может свидетельствовать о возможности миграции извне. Обнаруженные CD 68⁺ клетки различались по размеру и форме (округлые, овальные, удлинённые, некоторые клетки имели тонкие и утолщённые отростки). Присутствующие в стекловидном теле гиалоциты не имели коричневого пероксидазного окрашивания.

Вывод. По всей вероятности, обнаруженные в данном исследовании CD 68⁺ клетки принадлежат к линии макрофаги-микроглия. Как макрофаги, эти клетки играют важную роль в развитии тканевой глаза. Нельзя исключить, что CD 68⁺ клетки в склере могут также принадлежать фибробластам формирующейся склеры.

Работа проведена в рамках Госзадания № 0108-2019-0005 (ИБР РАН).

ЭКСПРЕССИЯ TLR9 В ВОРСИНАХ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ЗАДЕРЖКЕ РАЗВИТИЯ ПЛОДА И ПРЕЭКЛАМПСИИ

Наталья Викторовна Низяева, Эльрад Юсифович Амирасланов, Наталья Анатольевна Ломова, Елена Леонидовна Долгополова, Марина Николаевна Наговицына, Роман Гергиевич Шмаков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Niziaeva@gmail.com

Известно, что уровень фетальной ДНК может повышаться в плазме крови матери при акушерской патологии, источником которой являются апоптоз клеток плаценты, прежде всего трофобласта. TLR9 – рецептор врожденного противовирусного иммунитета, лигандом которого может выступать как вирусная, так и фетальная ДНК. Цель исследования: оценить экспрессию TLR9 в ворсинах плаценты при преэклампсии (ПЭ) и задержке развития плода (ЗРП). Критерии включения

в группу: с умеренной ПЭ были наличие гипертензии выше 140/90 мм. рт. ст. и протеинурии выше 0,3 г в сутки, и тяжелой ПЭ и выше 160/110 мм. рт. ст. и протеинурия > 5 г в сутки. На серийных парафиновых срезах было выполнено гистологическое (гематоксилином и эозином) и иммуногистохимическое исследование (Ventana; Roche) с применением первичных поликлональных антител к TLR9 (1:300; GenTex) на образцах плацент от 35 женщин на сроке 26–39 недель гестации, подвергнутых оперативному родоразрешению, у 15 пациенток диагностировали тяжелую ПЭ, у 8 беременных — умеренную ПЭ. Группу контроля составили 10 рожениц с неосложненной доношенной беременностью. У 8 женщин из группы тяжелой ПЭ отмечалась задержка роста плода. При количественной оценке было оценено окрашивание синцитиотрофобласта (СЦТ) в условных единицах при помощи системы анализа изображения NIS-Elements (Чехия) на базе микроскопа Nikon Eclipse. Для удобства представления данных все данные были умножены на 100. Различия оценивались как статистически значимые при $p < 0,05$. Было отмечено, что уровень экспрессии TLR9 при ПЭ тяжелой степени (ПЭТ), осложненной ЗРП, составил: $58 \pm 19,3$, что было значимо выше, чем в остальных исследуемых группах (при ПЭТ — $40,3 \pm 15$ и умеренной ПЭ — ПЭУ — $21 \pm 12,5$) ($p < 0,05$). В контрольной группе окрашивание было минимальным — $12 \pm 6,8$ соответственно ($p < 0,01$). Наряду с этим, в цитоплазме СЦТ обнаруживались окрашенные гранулы. Максимальное количество гранул (более 500 в пз, $\times 400$) присутствовало в СЦТ групп ПЭТ с ЗРП и ПЭТ, в контроле выявлялись лишь единичные гранулы. Количество гранул в цитоплазме СЦТ коррелировало со степенью тяжести ПЭ. Таким образом, при ПЭТ и ПЭТ осложненной ЗРП выявлены выраженные изменения экспрессии TLR9 в СЦТ ворсин плаценты, что может иметь важное значение в патогенезе преэклампсии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме «Исследование диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, эпигенетических факторов в развитии задержки развития плода».

ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ, В КЛЕТКАХ КУПФЕРА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Мария Петровна Никитина¹, Андрей Владимирович Ельчанинов^{2,3}, Анастасия Вячеславовна Лохонина^{2,3}, Андрей Витальевич Макаров^{3,4}, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов^{1,2}

¹ НИИ Морфологии человека, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ ФГБОУ ВО Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

mary.krutikova@gmail.com

Неотъемлемыми участниками репаративных процессов и воспалительных реакций в печени являются резидентные макрофаги — клетки Купфера. Главной функцией макрофагов является синтез и выделение

большого числа цитокинов, регулирующих морфогенетические процессы в печени. Разработка новых способов стимуляции регенерации печени невозможна без учета вклада в эти процессы макрофагов. Несмотря на это, механизмы активации клеток Купфера, регуляции синтеза и выделения цитокинов остаются пока малоизученными.

В рамках данной работы исследовано изменение экспрессии генов клеток Купфера, ассоциированных с воспалительными процессами, в процессе регенерации печени мышшей после частичной гепатэктомии. Экспрессию генов, связанных с воспалением, определяли на nCounter FLEX Analysis System на панели nCounter Mouse Inflammation V2. Валидировали результаты с помощью ПЦР в реальном времени. В процессе регенерации печени мышши в макрофагах были выявлены статистически значимые изменения экспрессии 86 генов ($FC > 2$, $p < 0,05$), ассоциированных с воспалительными процессами. Было получено, что экспрессия повышается у 18, 15 и 16 генов, а понижается у 28, 29 и 19 генов на первые, третьи и седьмые сутки после частичной резекции печени соответственно. Некоторые гены значительно изменяли свою экспрессию на раннем этапе регенерации печени, а затем возвращались к исходному уровню экспрессии. Например, гены хемокинов *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Ccl2*, *Ccl7*. Для иных генов были получены значимые отличия в уровне экспрессии только на позднем этапе регенерации. Например, для генов лимфотоксинов *Lta* и *Ltb*, и липооксигеназ *Alox12* и *Alox15*. В течение всего процесса регенерации наблюдали повышенный уровень экспрессии аргиназы *Arg1*. Было отмечено, что уровни экспрессии интерферона γ *Irfng* и хемокина *RANTES(CCL5)* были повышены в первые сутки после резекции, на третьи сутки, наоборот, значительно снижены и возвращались к исходному уровню к седьмым суткам.

Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции морфогенетических процессов, позволит разрабатывать новые более эффективные способы стимуляции репаративных ответов.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 17-15-01419.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЬЦЕВЫХ ХРОМОСОМ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Татьяна Владимировна Никитина¹, Анна Александровна Кашеварова¹, Алексей Гаврилович Мензоров^{2,3}, Станислав Анатольевич Васильев¹, Мария Михайловна Гридина², Анна Александровна Хабарова², Юлия Сергеевна Яковлева^{1,4}, Мария Евгеньевна Лопаткина¹, Марина Алексеевна Распопова⁴, Дмитрий Александрович Дериглазов⁴, Олег Леонидович Серов^{2,3}, Игорь Николаевич Лебедев^{1,4}

¹ НИИ медицинской генетики ТНИМЦ, Томск, Россия;

² ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁴ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

t.nikitina@medgenetics.ru

Вариабельность и неопределенность фенотипических проявлений кольцевых хромосом (КХ) является серьезной проблемой, поскольку не существует однозначной корреляции между размером или генным составом КХ,

ее стабильностью, распространенностью тканевого мозаицизма и тяжестью фенотипических аномалий у пациента. Экспериментальных исследований для выявления факторов, определяющих масштабы мозаицизма и стабильность КХ, пока не проводилось. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляются удобной платформой для изучения стабильности КХ в делящихся клетках.

Нами получены культуры фибробластов от пациентов с КХ 8, 13, 18 и 22 с последующим репрограммированием в ИПСК путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC с использованием лентивирусных векторов LeGO. Полученные линии демонстрировали экспрессию маркеров плюрипотентности и способность к дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Стабильность КХ оценивали на различных пассажах с помощью GTG, FISH и микроматричного анализа.

К настоящему времени стабильность КХ проанализирована для 2 линий с $r(22)$ и 4 линий с $r(13)$. В обеих линиях с $r(22)$ клетки с КХ устойчиво сохранялись и составляли абсолютное большинство на протяжении 38 и 60 пассажей, минорный класс представляли клетки с моносомией 22. Четыре линии ИПСК с $r(13)$ отличались разнообразием кариотипов: две из них состояли преимущественно из клеток с кариотипом 46,XY, $r(13)$, тогда как в двух других линиях преобладали клетки с кариотипами 46,XY,-13,+mar и 45,XY,-13. К 20 пассажиру кариотип 46,XY, $r(13)$ становился преобладающим во всех линиях независимо от предыдущего соотношения клеточных субпопуляций, однако в среднем после 25 пассажа в 3 из 4 линий появились клетки с рекуррентными трисомиями хромосом 17 и 12. Молекулярно-цитогенетическая характеристика с помощью микрочипов свидетельствовала о выраженной фрагментации КХ 13 и клеточной гетерогенности в 2 из 4 линий.

Таким образом: 1) существуют отличия в митотической стабильности разных кольцевых хромосом в ИПСК; 2) наблюдается разная степень динамического мозаицизма и микроструктурных aberrаций $r(13)$ в разных линиях ИПСК; 3) индуцированная плюрипотентность оказывается совместимой с широким спектром aberrантных кариотипов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10231.

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ МЕТОДИК СТЕРИЛИЗАЦИИ БИОИМПЛАНТАТОВ

**Надежда Анатольевна Николаева¹,
Владимир Викторович Розанов^{2,3}, Игорь
Васильевич Матвейчук³, Александр Петрович
Черняев², Лия Никитична Саввинова¹**

¹ Северо-Восточный Федеральный Университет,
Якутск, Россия;

² Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

³ Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений, Москва,
Россия

larsoon696@mail.ru

Комбинированные методики стерилизации костных имплантатов, как показывают исследования и разработки последних лет открывают реальные перспективы расширения использования радиационных технологий

в биомедицинских применениях. Актуальность этих исследований определяется постоянно возрастающей потребностью в пластическом материале для проведения восстановительных операций, удовлетворить которую можно путем развития технологий изготовления биоимплантатов. При этом одной из важнейших задач является обеспечение безопасности реципиента через надежную стерилизацию биоимплантатов. Оценки показывают, что несмотря на серьезные побочные эффекты порядка 50% рынка применения стерилизационных технологий занимает обработка оксидом этилена. Чуть более 40% приходится на обработку γ -излучением. Это эффективная методика, сопряженная, однако, с рядом ограничений, связанных, в частности, с проблемами обеспечения радиационной безопасности при использовании постоянно излучающих радиоизотопов. Конкуренция данному методу в последние годы составляет использование пучков быстрых электронов. Их применение позволяет значительно сократить время экспозиции, необходимое для эффективной инактивации патогенов (с суток до мин.). В то же время электроны не обладают высокой проникающей способностью γ -квантов, что может быть существенно при обработке некоторых объектов. Однако такое распределение не исчерпывает все возможности радиационного воздействия. Лишь несколько процентов приходится на такой источник излучения, как рентгеновские лучи, сочетающие высокую проникающую способность γ -излучения и возможность отключения излучения при завершении работы как у электронов. Его применение не требует использования дорогостоящих ускорителей. Эти и другие преимущества делают использование рентгеновского излучения перспективной методикой в развитии комбинированных технологий стерилизации биоимплантатов.

БИОКАТАЛИЗ В СИНТЕЗЕ ПОЛИЭФИРАМИДОВ — ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

**Максим Владимирович Никулин,
Витаутас-Юозапас Каятоно Швядас**

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

nikulin000@mail.ru

Биоразлагаемые синтетические полимеры в последнее время находят все более широкое применение в медицине. При выборе биомедицинского материала важна не только его способность к биологическому разложению, но и биосовместимость, подходящие механические свойства, а также отсутствие токсичных продуктов распада. В этой связи значительный интерес представляют полиэфирамиды, в структуре которых присутствуют сложноэфирные связи, обуславливающие способность к биоразложению, и амидные связи, придающие полимерному материалу термомеханические свойства полиамидов. Полиэфирамиды привлекают интерес как материалы для терапевтических устройств, таких как временные протезы и трёхмерные пористые структуры в качестве каркасов для тканевой инженерии. Способность полиэфирамидов стимулировать адгезию и пролиферацию клеток может быть полезна в регенеративной медицине. На основе полиэфирамидов могут быть созданы системы доставки лекарств с контролируемым высвобождением. В связи с этим

развитие методов синтеза полиэфирамидов различной структуры является практически важной задачей, а окси- и аминокислоты представляют перспективный строительный материал для их получения. В качестве мономеров для синтеза полиэфирамидов могут быть использованы замещенные 2,5-дикетоморфолины — шестичленные гетероциклы, являющиеся продуктами конденсации α -амино- и α -оксикислот, а также сложные эфиры N-оксиацил-аминокислот. Впервые разработанный метод хемознзиматического синтеза производных 2,5-дикетоморфолина и сложных эфиров N-оксиацил-аминокислот с использованием доступного фермента пенициллинацилазы и простых исходных реактивов — амидов оксикислот, аминокислот и их сложных эфиров позволяет получать мономеры в энантимерно чистой форме с высоким выходом и избежать многостадийного органического синтеза. Таким путём можно получить мономеры с широким разнообразием функциональных групп, что, в свою очередь, обеспечивает разнообразие структур и функциональных свойств получаемых полимеров. Дополнительные перспективы при получении полиэфирамидов связаны также с применением ферментов, в первую очередь липаз, как катализаторов полимеризации. Сочетание химических и ферментативных методов делает возможным получение ранее неизвестных биоразлагаемых полимеров с широким разнообразием свойств и открывает путь для использования новых биоразлагаемых полимеров в медицине.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-08-01637).

СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ СПОСОБНЫ К САМООРГАНИЗАЦИИ IN VITRO С ОБРАЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ЛОКАЛЬНЫХ МИКРООКРУЖЕНИЙ

Петр Петрович Нибирицкий^{1,2}, Роман Юрьевич Еремичев^{1,2}, Наталья Андреевна Александрович^{1,2}, Екатерина Сергеевна Новоселецкая¹, Георгий Дмитриевич Сагардзе^{1,2}, Михаил Спартакович Арбатский², Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}, Всеволод Арсеньевич Ткачук^{1,2}, Павел Игоревич Макаревич^{1,2}

¹ Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

nimiritsky@gmail.com

Для эффективного функционирования ткани необходимы: достаточное число здоровых клеток, определенного типа, находящихся в оптимальном микроокружении, а также регуляторная и метаболическая интеграция этой ткани в физиологические системы организма. Оба этих комплексных критерия можно рассматривать как проявления состояния структуры ткани. Под структурой понимается взаимное расположение элементов (клеток и их локальных микроокружений) в пространстве, которое стабилизировано связями между ними. При таком подходе различия между физиологической и репаративной регенерацией значительно редуцируются: первая заключается в восстановлении клеточного состава ткани с сохраненной структурой (обновлении), а вторая требует восстановления разрушенной структуры. Каждое звено процесса восстановления клеточного состава (пролиферация, миграция, дифференцировка) изучается наукой

о стволовых клетках. Наши интересы обращены к выяснению механизмов восстановления структуры тканей, мы считаем строму и ее клетки обоснованным претендентом на роль «организатора» в этом процессе.

Мы обнаружили, что мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека при культивировании в виде клеточных пластов (КП) способны к самоорганизации на 12–14 сутки в стандартных условиях без внешних стимулов. Путем совместной скоординированной миграции и контракции клетки образуют макроскопически различимые скопления с отличной от остального КП толщиной, плотностью и особенностями морфологии клеток. Используя лазерную микродиссекцию и иммунодетекцию, мы обнаружили различия состава белков внеклеточного матрикса (ВКМ) между этими скоплениями и остальным КП. Удельное количество коллагена-1 было в 3–5 раз выше в областях плотных скоплений, нежели в окружающих областях, а доля фибронектина в различных областях КП была сопоставимой. Мы обнаружили и неравномерность распределения некоторых ростовых факторов (TGF β , NGF) в КП. Чтобы изучить воздействие этой разницы МСК, было произведено РНК-секвенирование. Мы обнаружили различия транскриптомного профиля между клетками, находящимися в различных микрокомпартаментах. Эти различия могут создавать анизотропию локальных микрокомпарментов в пространстве, являться первичной структурой из самоорганизующихся клеток стромы, направляющей дальнейшее восстановление структуры после появления в анизотропной строме других клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-75-00067 (иммунодетекция матрикса) и 19-75-30007 (культура клеток и микродиссекция); грантом РФФИ № 19-515-52003 (РНК-секвенирование)

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕТЧАТКИ IN VIVO У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Юлия Петровна Новикова, Валентина Антониновна Поплинская, Элеонора Нораировна Григорян

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

novikovayulia@gmail.com

Ремоделирование сетчатки (РС) — явление, представляющее собой одно из последствий патологических изменений, вызванных повреждением популяций нейронов сетчатки вследствие заболевания или травмы. Мы исследовали РС на моделях у низших и высших животных, для понимания основных закономерностей явления. РС у амфибий (взрослых тритонов *P. waltl.*) изучали в условиях *in vivo* (после облучения сетчатки глаза ярким светом, отслойки сетчатки) и *in vitro* (3D тканевого культивирования). Были выявлены регенераторные ответы со стороны трех клеточных популяций: ретинального пигментного эпителия (РПЭ), биполярно-подобных клеток внутреннего ядерного слоя и глиальных клеток Мюллера. Первые мигрировали вовнутрь в толщу сетчатки, делились и встраивались в структуру сетчатки, замещая погибшие нейроны. Вторые смещались в наружный ядерный слой и, дифференцируясь, восполняли утерю фоторецепторов. Третьи — макроглиальные клетки — демонстрировали

гипертрофию и пролиферацию. В условиях тканевого 3D культивирования, сетчатка тритона обнаруживала способность реконструирования с участием тех же клеток, а также клеток ростовой зоны сетчатки. Таким образом, РС у тритона основана на ее регенерации, сохраняющей жизнеспособность и функцию.

РС у высших позвоночных *in vivo* изучали на модели индуцированной ярким светом дегенерации сетчатки у взрослых крыс Wistar. Здесь РС проявлялось в виде вымещения клеток РПЭ и трансформации их в макрофагальный фенотип, топологической транслокации биполяров и амакриновых клеток на место «выбитых» светом фоторецепторов, а также глиального ответа. Клеточные механизмы для РС у крысы оказались сходными с таковыми у тритона, но из-за невозможности репрограммирования клеток сетчатки крысы в нейральном направлении не приводили к клеточному замещению и сохраняли только целостность структуры сетчатки. Результаты экспериментов в условиях культивирования «whole amount» сетчатки крысы подтвердили данные, полученные на модели облучения светом. Таким образом, исследованные нами клеточные механизмы РС у разных животных свидетельствуют о возможности в условиях патологии и клеточной гибели поддерживать структуру этого важнейшего сенсорного органа за счет сходных клеточных популяций, однако регенерация сетчатки остается прерогативой амфибий, но не млекопитающих.

О МЕХАНИЗМЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСОСОМ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, НА МИОГЕНЕЗ *IN VITRO*

Анна Никитична Новокрещенова¹, Нина Николаевна Буторина¹, Ольга Викторовна Паюшина², Ольга Николаевна Шевелева¹, Елена Ивановна Домарацкая¹

¹ Лаборатория клеточных и молекулярных основ гистогенеза, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

nnbut@mail.ru

Введение. Экзосомы, выделяемые мезенхимальными стромальными клетками (МСК), обладают регенеративным потенциалом и способствуют пролиферации клеток *in vitro*. Представляется возможным применение очищенных экзосом вместо МСК для терапии мышц после травм и при врожденных мышечных патологиях. Одной из версий механизма действия экзосом является перенос ими микроРНК, регулирующих разные клеточные процессы, в том числе миогенез. В данной работе исследовано влияние экзосом МСК на миогенез *in vitro* и их состав микроРНК.

Материалы и методы. Источником экзосом служили крысиные МСК жировой ткани (ЖТ-МСК), костного мозга (КМ-МСК), интактных (М-МСК) и поврежденных мышц (ПМ-МСК). МСК костного мозга выделяли из костей путем вымывания средой DMEM, а МСК жировой и мышечной тканей — путем обработки коллагеназой. Экзосомы выделяли из кондиционированных сред культур второго и третьего пассажей методом ультрацентрифугирования. Влияние экзосом на миогенез исследовали на культуре миобластов 9-дневных крысят. Методом ПЦР в реальном времени выявляли в образцах экзосом наличие промиогенных микроРНК — miR27b, miR181 и miR494.

Результаты. Все виды исследованных промиогенных микроРНК были обнаружены в экзосомах КМ-МСК, и лишь один из них (miR494) — в экзосомах ПМ-МСК. Однако в экзосомах ЖТ- и М-МСК эти микроРНК практически отсутствовали. Такой результат позволил предположить, что КМ-МСК и ПМ-МСК окажут выраженное промиогенное действие *in vitro*.

После добавления экзосом из всех источников число миотуб в культуре значительно увеличилось. Также после добавления экзосом в миотубах определялось большее количество ядер по сравнению с контролем, что прямо свидетельствует об ускорении миогенеза. Результаты различались между источниками экзосом: вопреки данным ПЦР, наиболее эффективными оказались экзосомы М-МСК, увеличившие количество миотуб почти в 5 раз. При этом экзосомы КМ- и ПМ-МСК оказали не столь выраженное действие.

Тот факт, что экзосомы М-МСК больше других усилили миогенез, несмотря на отсутствие в них исследованных промиогенных микроРНК, можно объяснить либо наличием в них других микроРНК, не включенных в опыт, либо принципиально иным механизмом действия. Вопрос о том, за счет чего экзосомы оказывают свое терапевтическое действие — микроРНК, мРНК или белков — является открытым и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена в рамках Программы Президиума РАН № 41 «Фундаментальные исследования для разработки медицинских технологий», раздел Государственного задания № 0088-2019-0013.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ/ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*: РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Екатерина Сергеевна Новоселецкая¹, Ольга Александровна Григорьева¹, Наталья Андреевна Басалова¹, Константин Юрьевич Кулебякин², Мария Александровна Кулебякина², Петр Петрович Ниммирицкий¹, Павел Игоревич Макаревич¹, Всеволод Арсеньевич Ткачук², Анастасия Юрьевна Ефименко¹

¹ Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kuznecova2793@mail.ru

Внеклеточный матрикс (ВКМ) является важнейшим компонентом клеточного микроокружения, необходимым для поддержания жизнеспособности клеток и регулирующим их поведение, включая стволовость, пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Ключевую роль в процессах регенерации тканей и регуляции резидентных стволовых клеток играют мезенхимальные стромальные клетки (МСК) за счет секреции широкого спектра растворимых факторов, внеклеточных везикул и компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), формирующих специфическое микроокружение для стволовых клеток. По нашим данным наиболее представленной в секретоме МСК группой факторов являются компоненты ВКМ. Однако как влияет ВКМ, продуцируемый МСК, на поддержание и дифференцировку стволовых клеток, содержащихся в популяции МСК, остается малоизученным.

В нашей работе мы моделировали специфическое микроокружение МСК *in vitro* с помощью культивирования клеток на ВКМ, полученном путем децеллюляризации

клеточных пластов (дВКМ), сформированных иммортализованными человеческими МСК. Децеллюляризацию проводили по разработанному нами протоколу с использованием детергента (CHAPS) и ДНКазы I. Влияние дВКМ на дифференцировку первичных МСК жировой ткани человека, которые были получены из биобанка Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова (ID: MSU_MSC_AD), в адипогенном и остеогенном направлениях в индукционных средах оценивали по гистохимическому окрашиванию специфическими красителями и подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени. Первичные МСК адгезируют и пролиферируют в данных модельных условиях. Мы показали, что дВКМ существенно стимулирует дифференцировку МСК в обоих направлениях на ранних стадиях. При оценке изменений внутриклеточного сигналинга в МСК с помощью вестерн-блота белков ядерной и цитоплазматической фракций было показано, что при культивировании на дВКМ в клетках снижена экспрессия основных участников сигнальных путей, таких как pERK и активный β -катенин, что коррелирует с пролиферативной активностью клеток и их способностью отвечать на индуцирующие дифференцировку сигналы.

Результаты, полученные при моделировании приближенного к нативному микроокружения МСК с помощью дВКМ, могут стать основой для дальнейших исследований роли МСК в регуляции стволовых клеток *in vivo*, а также для разработки новых подходов в регенеративной медицине.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-75-30007).

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕИВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ И БЕСКЛЕТОЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Екатерина Сергеевна Новоселецкая^{1,2}, Евгения Юрьевна Паршина³, Надежда Александровна Браже³, Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Биологическая факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kuznecova2793@mail.ru

В современных подходах тканевой инженерии всё чаще используют культивирование в формате 3D, позволяющее сохранять для клеток *in vitro* специфическое микроокружение, необходимое для поддержания базовых функций, таких как жизнеспособность, пролиферация и дифференцировочный потенциал. Примерами 3D культивирования являются эксплантные культуры, клеточные пласты, сфероиды и децеллюляризованный матрикс тканей и органов. Однако, отслеживание состояния каждой отдельной клетки в такой системе остаётся сложной задачей, связанной с рядом проблем, например, с возможностью анализа нативного образца без применения каких-либо специальных реагентов и меток. Одним из перспективных решений такой задачи является применение спектроскопии комбинационного рассеивания (КР), или Рамановской спектроскопии, зарекомендовавшей себя как метод, позволяющий без использования специфических маркеров оценить распределение различных веществ в составе клетки и, соответственно, сделать выводы о состоянии клетки, например, степени

коммитированности или метаболическом статусе, а также детектировать перерождение в опухолевую клетку. В данной работе мы использовали метод спектроскопии КР для оценки молекулярного состава клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, в том числе после децеллюляризации.

В нашей работе для получения клеточных пластов были использованы иммортализованные человеческие МСК (hTERT MSC, ATCC), культивируемые 14 дней. В течение этого времени клетки формировали многослойный пласт, в котором клетки депонировали белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Децеллюляризацию клеточных пластов (дВКМ) проводили по разработанному нами протоколу с использованием детергента (CHAPS) и ДНКазы I. Образцы исследовали с помощью микроспектроскопии КР с использованием конфокального КР-спектрометра NTEGRA Spectra (HT-MDT, Зеленоград) при лазерном возбуждении 532 нм, мощности лазера на выходе из объектива 0,5 мВт (объектив $\times 20$, NA 0.45) и времени регистрации спектров 30–60 с. Результаты проведенного исследования показали, что клеточный пласт и дВКМ неоднородны по плотности распределения белковых и липидных молекул. При децеллюляризации сохраняется третичная структура белков, однако в некоторых участках дВКМ наблюдали пики холестерина, а также урацила и цитозина. Четким отличием дВКМ от клеточного пласта являлось увеличение в составе дВКМ относительного содержания липидов по сравнению с сопоставимыми областями в клеточном пласте, в которых были проведены измерения. Этот результат демонстрирует возможности метода для детекции внеклеточных везикул с разным содержанием в составе ВКМ. Спектры от отдельно взятой клетки в составе клеточного пласта были зарегистрированы от разных участков цитоплазмы, в которых относительное содержание липидов может быть меньше, чем в слое матрикса с липидными везикулами. Кроме того, КР спектры клеток в зависимости от участка содержали пики восстановленных цитохромов дыхательной цепи митохондрий, отражая таким образом, энергетическое состояние клеток.

Результаты, полученные при изучении молекулярного состава клеточного пласта и дВКМ, могут стать основой для изучения статуса МСК в трехмерных конструкциях и анализа состава бесклеточных продуктов при моделировании микроокружения клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-315-90060.

СОЗДАНИЕ РЕПОРТЕРНОГО ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА LEGO-REX1-EGFP ДЛЯ ОТБОРА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Артем Рустамович Нурисламов¹, Вениамин Семенович Фишман^{1,2}, Алексей Гаврилович Мензоров^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

² ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

a.nurislamov@g.nsu.ru

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) используются для моделирования заболеваний и изучения роли генов. Обычно отбор колоний ИПСК идет по морфологии и не все линии клеток плюрипотентны. Мы поставили задачу разработать метод для быстрого и простого выявления клеток, не обладающих плюрипотентностью: использование репортерного

вектора на основе лентивируса, кодирующего *EGFP* под контролем промотора гена-маркера плюрипотентности, *REX1*. Для первичного выявления плюрипотентных клеток достаточно обработать несколько колоний лентивирусами и через два дня определить, есть ли свечение *EGFP*. Преимущества использования лентивирусов: 1) простота обработки клеток и анализа; 2) доставка генетического материала практически во все клетки; 3) трансдукция клеток различных видов млекопитающих; 4) замолкание лентивирусных трансгенов в плюрипотентных клетках. Иммуноцитохимический анализ на гены-маркеры *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* имеет недостатки: экспрессия *Oct4* и *Sox2* в ИПСК может быть экзогенной, а *Nanog* практически не экспрессируется в ИПСК Американской норки. *Rex1* — маркер плюрипотентности не только ИПСК человека, но и других видов млекопитающих. Использование промотора *REX1* для контроля экспрессии *EGFP* позволяет быстро элиминировать не плюрипотентные клетки.

Для создания репортерного вектора мы использовали промотор *REX1* из плазмиды *phREX1-Luc* (Addgene, 17222) и вектор *LeGO-G2* (Addgene, 25917). Плазмиду *phREX1-Luc* гидролизировали эндонуклеазами рестрикции *BglII*, *CciI* и *XbaI*, затем выделили из агарозного геля фрагмент, содержащий промотор. Полученный фрагмент лигировали с вектором *LeGO-G2*, гидролизованным по сайтам рестрикции *CciI* и *BamHI*. В результате мы получили плазмиду *LeGO-REX1-EGFP*, несущую ген *EGFP* под контролем промотора гена *REX1* и содержащую компоненты, необходимые для сборки псевдотипированных лентивирусов.

Мы показали, что трансфекция клеток Phoenix (HEK293) и эмбриональных стволовых клеток мыши DGE51 плазмидой *LeGO-REX1-EGFP* приводит к ожидаемой экспрессии *EGFP* с промотора CMV. Следующий этап тестирования репортерного вектора — трансдукция лентивирусами плюрипотентных клеток различных видов млекопитающих.

Использованы линии клеток ЦКП «Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепроцессуального и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL; <http://ckp.icgen.ru/cells/>).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00644.

КОМПЬЮТЕРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ХРОМОСОМНЫХ КОНТАКТОВ В КЛЕТКЕ

Юрий Львович Орлов¹⁻⁴, Сергей Сергеевич Ковалев^{2,3}, Артур Игоревич Дергилев³, Роман Олегович Бабенко^{2,3}, Эльвира Расимовна Галиева³, Елена Юрьевна Леберфарб²

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ФИЦ "Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Москва, Россия;

³ Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия;

⁴ Геномный Институт Сингапура (Genome Institute of Singapore), Сингапур

orlov@d-health.institute

Развитие экспериментальных технологий, основанных на высокопроизводительном секвенировании ДНК и иммунопреципитации хроматина, дает возможность исследования регуляторных портретов, в том числе в эмбриональных стволовых клетках [1, 2]. Было показано

существование кластеров сайтов транскрипционных факторов в геноме, функционирующих в эмбриональных стволовых клетках мыши, связанных с факторами репрограммирования и поддержания плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* [2]. Исследование хромосомных контактов в интерфазном ядре клетки имеет огромное значение для понимания молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов, хромосомном регуляторном коде и его влиянии на развитие заболеваний [3]. Последнее десятилетие активно развиваются методы исследования хромосомных контактов в геноме — Hi-C и ChIA-PET. Технология Hi-C (High conformation Capture — «конформации хромосом высокого порядка») позволяет определять все хромосомные контакты в ядре клетки. Технология ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End-Tag sequencing) включает стадию иммунопреципитации хроматина и предназначена для исследования хромосомных контактов, опосредованных белком [3]. Было показано существование обширных промотор-ориентированных хромосомных контактов в геноме человека [4]. Проведен вычислительный эксперимент по анализу сайтов связывания в геноме человека по базам данных ENCODE, Cistrome, показано присутствие кластеров сайтов связывания факторов плюрипотентности. В данной работе мы представляем обзор компьютерных методов обработки данных о хромосомных контактах в различных типах клеток, обсуждаем ландшафт транскрипции в опухолевых стволовых клетках.

Благодарности. Работа поддержана РФФИ [грант 19-15-00219] (ЮО, РБ, ЭГ). СК поддержан бюджетным проектом ИЦиГ 0259-2019-0002.

Литература:

1. Chen X., Xu H., Yuan P. et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008; 133(6): 1106–17.
2. Цуканов А.В., Дергилев А.И., Богомолов А.Г., Орлов Ю.Л. Реконструкция геномного распределения кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов, связанных с поддержанием плюрипотентности. Гены и клетки 2018; Приложение № 1: 114.
3. Fullwood M.J., Liu M.H., Pan Y.F. et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 2009; 462(7269): 58–64.
4. Li G., Ruan X., Auerbach R.K. et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* 2012; 148(1–2): 84–98.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ЯЗВ

Екатерина Вадимовна Орлова, Людмила Михайловна Смирнова, Ляйля Наилевна Каюмова, Полина Геннадьевна Свист

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

polina_svt@mail.ru

Важнейшей медико-социальной проблемой является лечение трофических язв различной этиологии в том числе на фоне язвенно-некротического ангиита (ЯНА), протекающий с выраженными нарушениями трофики кожи и имеющим изначально торпидное течение. Низкая интенсивность реэпителизации при ЯНА связана со снижением скорости миграции и пролиферации кератиноцитов на фоне изменения состава матрикса и активности цитокинов, выделяемых фибробластами и макрофагами

в раневую среду. В длительно незаживающих язвах снижен уровень $\alpha 5\beta 1$ -интегрин, что определяет немигрирующие фенотипы кератиноцитов. В следствии этого клеточная терапия язвенных дефектов аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (АМСК) является перспективной за счет высокой пролиферативной активности клеток продуцирующих ростовые факторы, интерлейкины и хемокины, участвующие в формировании и функционировании стромального микроокружения, что влияет на регенерацию кожных покровов в короткие сроки.

Цели. Разработка методики применения АМСК в терапии ЯНА по результатам сравнительного, нерандомизированного, проспективного, одноцентрового исследования.

Задачи. Сравнительная оценка эффективности и безопасности применения АМСК в клеточной терапии ЯНА в сравнении со стандартным лечением.

Материалы и методы. Группа из 4 пациентов в процессе наблюдения с язвами, существующими более 3 месяцев, площадью до 7 см, получавшие стандартные схемы терапии не приведшие к рубцеванию дефекта на 50% и более.

АМСК — суспензию живых аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученную путем аспирации костного мозга при проведении пункции гребня подвздошной кости согласно инструкции с помощью стандартного хирургического инструментария и лекарственных средств в процедурном кабинете. В технологической цепочке АМСК используют реагенты, оборудование и расходные материалы, отвечающие требованиям GMP. Клеточный продукт имеет вид опалесцирующей жидкости содержащей МСККМ в индивидуальной дозировке из расчета 40 000 клеток на 1 см² язвы в физиологическом растворе; наносится на язвенный дефекта с помощью пипетки-дозатора с одноразовым стерильным наконечником объемом 1000 мкл. Экспозиция 15 мин. до покрытия стерильной повязкой. Кратность наблюдения 1 раз в 2 недели.

Выводы. При контроле на 14 сутки отмечено уменьшение воспалительного процесса, второй и последующие контрольные осмотры показали динамическое рубцевание язвы на 25–40% площади, что подтверждает эффективность АМСК в комплексной терапии торпидного варианта ЯНА.

ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОДУКТОВ

Надежда Валерьевна Орлова¹, Александр Николаевич Муравьев^{1, 4}, Татьяна Ивановна Виноградова¹, Наталья Михайловна Юдинцева², Юлия Александровна Нащекина², Александр Анатольевич Лебедев¹, Магомедсадик Гасанович Шейхов¹, Петр Казимирович Яблонский^{1, 3}

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

nadinbat@gmail.com

До сих пор остро стоит вопрос хирургической реконструкции мочевого пузыря (МП). В настоящее время при

неэффективности консервативных методов применяют замещение МП фрагментами желудочно-кишечного тракта, что приводит к ряду осложнениям. Зарубежными учеными предпринят удачный опыт замещения МП у человека выращенным *in vitro* тканевым аналогом, содержащим аутологичные гладкие миоциты и уротелий. Однако при ряде патологий использование аутологичного материала невозможно. Перспективной для таких пациентов является аллогенная клеточная трансплантация. Мировой опыт экспериментального применения аллогенных клеток для реконструкции МП ограничивается несколькими исследованиями.

Цель: экспериментальное изучение возможности применения аллогенного тканеинженерного композита для замещения дефекта стенки мочевого пузыря.

Материалы и методы: 15 кроликам выполнена парциальная резекция МП с последующим замещением дефекта скаффолдом на основе поли-L,L-лактида, содержащим аллогенные клетки различного тканевого происхождения: гладкие миоциты с уротелием, фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки (МСК), меченные железосодержащими наночастицами. Результаты оценивались через 2,5 месяца.

Результаты: у 5 из 6 животных, получивших скаффолд с МСК, не отмечено признаков отторжения имплантата. В конце периода наблюдения емкость МП была сравнима с дооперационной. Наличие меток в месте имплантации подтверждено данными магнитно-резонансной томографии. Визуально в месте имплантации определялся участок вновь сформированной стенки мочевого пузыря, в котором зафиксирована электромиографическая активность. Гистологически выявлены начальные стадии репарации и ангиогенеза. При конфокальной микроскопии криосрезов из зоны имплантации обнаружены меченые клетки, принимающие участие в формировании структуры, сходной с уротелием. Во всех случаях имплантации бесклеточной матрицей или скаффолдов, содержащих гладкие миоциты с уротелием и фибробласты, произошло отторжение имплантата с разной степени выраженности воспалительной реакцией и уменьшением емкости МП.

Заключение: выполненный эксперимент подтверждает возможность применения аллогенных МСК в составе многокомпонентного композита для частичной реконструкции МП. Дальнейшая разработка и внедрение в практику методик создания тканеинженерных аналогов мочепузырной стенки может способствовать улучшению результатов лечения урологических патологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00068 и гранта РФФИ № 13-04-12027 ofi_m.

НОРМАЛИЗАЦИЯ КАРИОТИПА ИПСК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТА С МАСШТАБНОЙ ДУПЛИКАЦИЕЙ ДИСТАЛЬНОГО УЧАСТКА ТРЕТЬЕЙ ХРОМОСОМЫ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ

Полина Орлова^{1, 2}, Мария Гридина¹, Алексей Кораблев¹, Олег Серов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск Россия

p.orlova@g.nsu.ru

Широкое применение метода сравнительной геномной гибридизации выявило высокую частоту встречаемости

структурных вариации генома (CNV, copy number variation) в популяции человека. Зачастую именно CNV являются причиной различных врожденных и наследственных патологий человека. Другая технология, получившая широкое развитие за последние десять лет — получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с последующей их дифференцировкой *in vitro*, открывает потенциальную возможность их применения в регенеративной медицине. Таким образом представляется важным разработку методов коррекции масштабных хромосомных перестроек.

Хромосомные перестройки дистального участка третьей хромосомы, как делеции, так и дупликации вызывают разнообразные нейрологические, нейропсихиатрические и нередко дисморфозные нарушения, (микроцефалия, гидроцефалия, аномалии лицевой части черепа и др.), а также заболевания аутистического спектра. Ранее нами были получены ИПСК из фибробластов биоптата кожи пациента с недифференцированной умственной отсталостью. В геноме этого пациента была обнаружена микродупликация размером 0,94 Mb в районе 3p26.3, затрагивающая единственный ген — *CNTN6*, кодирующий белок контактин-6. На примере дупликации, обнаруженной у пациента, мы планировали разработать технологию, позволяющую проводить коррекцию крупных хромосомных перестроек в геноме ИПСК человека.

Используя систему направленного редактирования генома CRISPR/Cas9 мы вставили однонаправленные LoxP сайты в геном ИПСК по границам одного из дублированных участков. После чего, трансформировав данные клетки плазмидой, содержащей *cre*-рекомбиназу, мы получили удаление одной из дублированных копий. Таким образом, проведена коррекция числа копий гена *CNTN6*, что позволяет получать нейроны *in vitro* из ИПСК с нормализованным кариотипом.

Финансирование исследования: исследование выполнено при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ BMP-2 И FGF-2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЛИНИИ МЫШИНЫХ МИОБЛАСТОВ C2C12 В ОСТЕОБЛАСТЫ

Юлия Михайловна Орлова, Ирина Евгеньевна Трубицына

ГБУЗ Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

yulia.doctor@gmail.com

Введение. Лечение мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), остается делом будущего. Известно, что экспрессия межклеточного матрикса может приводить как к стимуляции, так и торможению процессов регенерации и дифференциации.

Цель. Изучить механизмы действия аллогенных мезенхимальных стромальных клеток крыс на процессы регенерации поврежденной ткани.

Материал и методы. Первая серия исследований — *in vivo*: с первых часов воспроизведения экспериментальной модели панкреатита (ЭМП) развивается: отек; кровоизлияния; сегментоядерная инфильтрация; мононуклеарная инфильтрация; некроз ацинарных клеток; стеатонекроз; перидуктальный фиброз. После введения МСК происходит восстановление новых протоков и сосудов. Снижен процент образования соединительной ткани на 45%, в сравнении с контролем. В первые 48–55 часов после воспроизведения ЭМП однократное введение

МСК малоэффективно. Положительный эффект отмечен после двукратного введения МСК на 3 и 15 сутки. Для установления механизмов действия МСК была проведена серия экспериментов *in vitro* в культуральной жидкости наблюдается взаимосвязь между факторами роста (FGFs), регулирующим регенерацию и морфогенетическими белками (BMPs), отвечающими за дифференцировку линии мышечных миобластов C2C12 в остеобласты. С помощью ПЦР оценивали дифференциацию остеогенных клеток и регуляцию функции остеобластов.

Результаты и обсуждение. Подтверждено, что для активации RUNX-2 остеогенных белков необходима его кооперация с костным морфогенетическим белком-2 (BMP-2), который стимулирует ацетилирование RUNX-2. FGF оказывал дозозависимое действие на (BMP-2). Установлено, что FGF в концентрации 20 нг, подавлял активность BMP. Выявлена обратная взаимосвязь воздействия FGF на BMP. FGF негативно влияет на эффект BMP, в таком случае будет усилена пролиферация остеобластов, но снижена дифференциация остеобластов в зрелые остеобласты.

Заключение. Определена оптимальная комбинация между FGFs и BMPs: концентрация FGF должна быть 0,1–0,5 нг/мл, а BMP 500 нг/мл. Нарушение взаимосвязи между этими факторами нарушает баланс между пролиферацией и дифференцировкой. Это в свою очередь может стимулировать опухолевый рост или нарушать качество заживления. Полученные данные как *in vivo*, так и *in vitro* позволили установить положительный эффект и безопасность действия МСК.

КОЛЛАГЕН VISCOLL: БИОПОЛИМЕРНЫЙ МАТРИКС ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И ТРЕХМЕРНЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ МЕТОДОМ 3D ПЕЧАТИ

Егор Осидак¹, Павел Каралкин^{2,3}, Мария Осидак¹, Владислав Парфенов², Дмитрий Сивогринов¹, Фредерико Д.А.С. Перейра², Анна Грядунова^{2,7}, Елизавета Кудан², Юсеф Хесуани², Владимир Касьянов⁶, Сергей Белоусов⁴, Сергей Крашенинников⁴, Тимофей Григорьев⁴, Сергей Чвалун⁴, Елена Буланова², Владимир Миронов^{2,7}, Сергей Домогатский^{1,5}

¹ ООО «Имтек», Москва, Россия;

² ЧУ 3D Bioprinting Solutions, Москва, Россия;

³ Отделение прогноза эффективности консервативного лечения, НМИЦ Радиологии Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия;

⁵ ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

⁶ Riga Stradins University and Riga Technical University, Рига, Латвия;

⁷ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

oego@imtek.ru

Введение. Метод 3D биопечати путем экструзии является мощным инструментом, который можно использовать для создания искусственных тканей, в основе которого лежит послыная прецизионная ориентация в пространстве гидрогеля с клетками (биочернил). Гидрогель является

ключевым компонентом в данном процессе сборки искусственной ткани. Коллаген является идеальным материалом с точки зрения биосовместимости. Однако чистый коллаген обладает низкой скоростью гелеобразования, что существенно затрудняет его использование для 3D биопечати. В данной работе с использованием коллагена Viscoll методом 3D биопечати были созданы трехмерные тканеинженерные конструкции с разрешением деталей до 0,5 мм.

Материалы и Методы. Высоковязкий раствор нативного коллагена (Viscoll, ООО «Имтек», Россия) использовался в качестве основного компонента для создания биочернил. Клетки NIH3T3/GFP в предварительно охлажденной среде немедленно смешивали с раствором нативного коллагена. Для оптимизации процесса 3D биопечати при помощи ротационного реометра была изучена температурно-зависимая кинетика гелеобразования биочернил. 3D биопринтер Fabion (3D Bioprinting Solutions, Россия) использовали для 3D биопечати тканеинженерных конструкций. Культивирование клеток в напечатанных конструкциях проводили в течение 14 дней.

Результаты. Получены стабильные трехмерные 10-слойные тканеинженерные конструкции с разрешением деталей до 0,5 мм. Также продемонстрировано, что коллагеновые биочернила обеспечивают не только выживание клеток во время процесса печати, но также поддержание их жизнеспособности и пролиферации в течение 14 дней.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что высоковязкий раствор нативного коллагена Viscoll является биополимерным матриксом для создания биомедицинских клеточных продуктов и трехмерных тканеинженерных конструкций методом 3D печати.

Финансирование исследования: исследование выполнено при поддержке гранта ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» № 0044700.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ЗАДНЕГО ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПОКРЫТИЯ КОЛЛАГЕНА I ТИПА

Дмитрий Сергеевич Островский¹, Максим Юрьевич Герасимов¹, Мадина Хетаговна Хубецова¹, Антон Дмитриевич Казанцев¹, Сергей Анатольевич Борзенко^{1,2}

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК» Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

Актуальность. Клетки заднего эпителия роговицы человека играют ключевую роль в регуляции гидратации роговицы. Воспроизводимая культура данных клеток в перспективе может служить источником аллогенного материала как для клеточной терапии заболеваний роговицы, так и для воссоздания биоинженерной конструкции роговицы.

Цель. Провести сравнительное исследование клеток заднего эпителия роговицы, культивированных на стандартной культуральной поверхности и при использовании биопокрывтия из коллагена I типа.

Материалы и методы. В исследовании использовались донорские роговицы, непригодные для

трансплантации по клиническим критериям с сохраненным задним эпителием, полученные из Глазного тканевого банка учреждения. Нанесение биопокрывтия из коллагена I типа осуществлялось на стандартную культуральную поверхность чашки Петри 35 мм. Выделение клеток проводили по протоколу, разработанному авторами ранее. Культивирование проводили в культуральной среде DMEM F12/199 (1:1), с 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% раствора антибиотиков и 2 мМ L-глутамин. Оценку фенотипа полученных клеток и клеток заднего эпителия нативной роговицы проводили методом иммуногистохимии. Для этого, полученные образцы окрашивали антителами к α -глакомышечному актину, виментину, люмикану, Na⁺/K⁺-АТФ-азе, N-кадгерину, E-кадгерину, цитокератин-7, -10, -13, -19, коннексину-43, ZO-1.

Результаты. Клетки, культивированные в чашке Петри с биопокрывтием коллагена I типа, отличались большей скоростью адгезии к культуральной поверхности. Количество клеток, с эпителиально-мезенхимальную трансформацию было достоверно выше в культуре, полученной в результате культивирования без использования биопокрывтия ($p < 0,001$). Достоверной разницы в скорости достижения конfluence между образцами, культивированными с использованием биопокрывтия и без него, выявлено не было. Достоверно меньший уровень экспрессии α -глакомышечного актина в культуре клеток, культивированных на биопокрывтии из коллагена I типа в сравнении как с интактными клетками нативной роговицы, так и с клетками, культивированными без использования биопокрывтия, позволяет косвенно судить о меньшей степени выраженности процесса эпителиально-мезенхимальной трансформации в данном образце.

Заключение. По результату проведенного исследования было доказано необходимость использования биопокрывтия из коллагена I типа для уменьшения эпителиально-мезенхимальной трансформации.

РАЗНООБРАЗИЕ GDNF И ЕГО РОЛЬ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

Галина Валериевна Павлова¹⁻³, Джиграла Владимировна Шамадыкова¹, Дмитрий Юрьевич Пантелеев¹, Надежда Николаевна Куст¹, Анастасия Александровна Чулкова⁴, Александр Владимирович Ревизин¹

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

² ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Институт молекулярной медицины, Москва, Россия;

⁴ ФГБОУ ВО Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

lkorochkin@mail.ru

Отсутствие эффективных форм лечения нейродегенеративных заболеваний провоцирует исследователей искать новые подходы к терапии, в том числе и с помощью клеточных технологий. Разрабатываются технологии по повышению жизнеспособности нейронов в зоне поражения и стимуляции нейральной дифференцировки прогениторных клеток для восполнения нейронов в области их гибели с помощью трансгенных клеточных культур. GDNF занимает приоритетные позиции для использования в качестве нейротрофактора и индуктора нейральной

дифференцировки прогениторных/стволовых клеток. Для подобных работ важно понимание, какие изоформы фактора приемлемы для клеточной терапии. Показано, что у человека ген GDNF представлен, по крайней мере, двумя матричными РНК, которые отличаются друг от друга размером рго-области. Исследования позволяют предположить, что один из вариантов GDNF экспрессируется постоянно и необходим для взаимодействия между нервными клетками в норме, другой же (меньший размер рго-области) секретируется и необходим при гибели нейронов для стимуляции восстановительных процессов. Мы показали, что делеция рге –и рго-области в химерном белке GDNF/GFP повышает нейротекторные свойства фактора. Полученный нами mGDNF/GFP обладал повышенными нейроиндукторными свойствами, что подтверждено на *in vitro* моделях эмбриональных спинальных ганглиев крысы и линии PC12. *In vivo* mGDNF/GFP оказался способен поддерживать жизнеспособность дофаминергических нейронов при введении в мозг модельных животных с болезнью Паркинсона и значительно защищал их от воздействия пронеуротоксина MPTP. При получении трансгенных клеток млекопитающих, продуцирующих mGDNF без GFP было обнаружено, что mGDNF оказался нестабильным. Мы обратили внимание на тот факт, что обнаруживаются несколько повторяемых коротких форм РНК GDNF. Появилась версия, что в ряде случаев в клетках может быть запущен процесс, когда продуктом является не целая форма mGDNF, а в результате альтернативного сплайсинга получают минифакторы, которые могут продуцироваться при массовой гибели нейронов и могут быть необходимы для восстановления клеточного нейронального пула. Нами были клонированы мажорные мини-последовательности mGDNF и проанализированы на нейроиндукторные свойства. Показано, что один из минифакторов DjGDNF показал способность стимулировать нейрональную дифференцировку прогениторных клеток и может рассматриваться, как перспективный фактор для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Работа поддержана программой Президиума РАН МКБ.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Светлана Андреевна Павлова^{1,2},
Анастасия Александровна Чулкова^{1,2},
Сергей Феликсович Дрозд¹, Людмила
Григорьевна Захарова¹, Надежда Сергеевна
Самойленкова¹, Александр Владимирович
Ревизин¹, Галина Валериевна Павлова¹

¹ ФГБОУ ВО Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

² Лаборатория нейрогенетики и генетики развития, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Pavlova.sweti@yandex.ru

В настоящее время глиомы являются одними из самых агрессивных опухолей у взрослого и работоспособного населения. Они составляют около 70% всех первичных опухолей головного мозга. Из них около 60% можно отнести к глиомам высокой степени злокачественности. Средний возраст больных около 50 лет. При глиомах высокой степени злокачественности (Grade III–IV) прогноз жизни, несмотря на современные подходы к лечению, составляет в среднем 12 месяцев.

В отличие от других злокачественных новообразований, в глиомах не наблюдается метастазирование через кровеносную и лимфатическую систему в другие органы, однако у них наблюдается локальная инвазивность и последующая миграция опухолевых клеток в нормальные ткани головного мозга, что делает лечение данного заболевания менее эффективным. Мигрировавшие клетки не могут быть удалены в результате хирургической операции, а особенности фенотипа делают их более устойчивыми и к другим типам терапии, в том числе и радиологической. Также терапию усложняет отсутствие каких-либо четких маркеров, позволяющих отличить опухолевые клетки от здоровых.

Целью представленной работы стало изучение молекулярных маркеров мигрирующих клеток глиомы человека; определение корреляции между фенотипом данных клеток, их миграционными способностями и степенью злокачественности исходной опухоли.

По итогам работы можно сделать следующие выводы.

Клеточные культуры глиом человека с высокой способностью к миграции характерны для высокой степени злокачественности (III и IV Grade).

Методом RT–PCR показана положительная корреляция между уровнем миграционной активности клеточных культур глиомы человека и уровнем экспрессии MELK и L1CAM и отрицательная корреляция между уровнем миграционной активности клеточных культур глиомы человека и уровнем экспрессии CIRBP и Nestin.

Иммуноцитохимическим анализом выявлено снижение CIRBP, Sox2 и CXCR4 в клеточных культурах глиомы человека с высоким уровнем миграции, что было подтверждено при проведении корреляционного анализа данных.

Обнаружено, что в клеточных культурах глиом человека наблюдается одновременное возрастание уровня экспрессии одних маркеров стволовости (L1CAM, CD133, GFAP) и падение — других (Nestin, Sox2, Oct4), что позволяет сделать предположение о наличии как минимум двух типов клеточных популяций опухолевых стволовых клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-01012.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, В ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МИОКАРДА

Софья Викторовна Павлова^{1–3}, Елена
Васильевна Чепелева⁴, Елена Вячеславовна
Дементьева^{1–3}, Сурен Минасович Закиян^{1–3,5}

¹ Лаборатория эпигенетики развития, ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Лаборатория молекулярной и клеточной медицины, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Лаборатория геномных медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Лаборатория экспериментальной хирургии и морфологии, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

⁵ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

sonpavlova@gmail.com

Ишемическая болезнь сердца и другие сердечно-сосудистые заболевания, которые сопровождаются быстрой

гибелью клеток, требуют поиска новых методов лечения, позволяющих восстанавливать утраченную ткань миокарда. Клеточная терапия заболеваний сердца является одной из перспективных медицинских технологий. Кардиомиоциты (КМ), полученные в результате направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека — наиболее перспективный тип клеток: они обладают свойствами сократимости, возбудимости, отвечают на сигналы симпатической и парасимпатической нервной системы. Показано, что КМ из ИПСК хорошо выживают в миокарде после трансплантации, однако остается много вопросов относительно их функциональной интеграции на клеточном и молекулярном уровнях, поскольку основными подходами оценки результатов трансплантации являются УЗИ- или МРТ-исследования физиологии сердца. В своей работе мы используем модели, на которых удобно изучать функциональные свойства трансплантированных КМ из ИПСК. Ранее мы проводили трансплантацию дезагрегированных КМ в суспензии белков экстраклеточного матрикса Matrigel™ с формированием подкожного трансплантата у мышей SCID. В ходе эксперимента мы показали сохранение способности к спонтанной осцилляции потоков ионов кальция у некоторых клеток из выжившей популяции КМ из ИПСК человека после 4х недель пребывания в организме мышей и предположили, что такие КМ могут быть пейсмейкерными. В настоящей работе мы проводили трансплантацию функциональных пластов КМ, сформированных на температурно-чувствительном пластике (Nunc™ Dishes with UpCell™ Surface, 4 см²). Пласты КМ вводили мышам SCID под фиброзную капсулу почки на срок от одной до 3х недель. После окончания эксперимента, трансплантат извлекался из организма для определения функциональных свойств. По предварительным данным, функциональные контакты между КМ в составе трансплантированных пластов сохранялись, и мы наблюдали согласованные сокращения извлеченного трансплантата, а с помощью красителя FluoV наблюдали распространение потоков ионов кальция. Таким образом, можно сказать, что существуют предпосылки для развития заместительной клеточной терапии миокарда на основе КМ из ИПСК. Однако на сегодняшний день в области тканевой инженерии сердца существует множество проблем, связанных как с незрелостью кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, так и формирования функциональной интеграции трансплантата с миокардом реципиента.

Работа поддержана грантом РФФ 18-75-10039.

ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ НЕ КОРРЕЛИРУЕТ С МЕТИЛИРОВАНИЕМ ГЕНА AR В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Александра Витальевна Панова^{1,2}, Александра Никитична Богомазова^{1,3}, Мария Андреевна Лагарькова^{3,1}, Сергей Львович Киселёв¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва, Россия;

² НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия;

³ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

a.v.panova@mail.ru

У млекопитающих в каждой клетке в раннем эмбриональном развитии происходит процесс дозовой компенсации генов: одна из двух X-хромосом становится

транскрипционно неактивной, и в дальнейшем во всех соматических клетках находится в неактивном состоянии. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), так же, как и клетки с индуцированной плюрипотентностью (ИПСК), являются моделью для изучения раннего развития. В женских ИПСК и ЭСК человека одна из X-хромосом всегда активна, состояние второй вариабельно: может быть полностью активной, так и иметь частичную инактивацию, или же, аналогично соматическим, может быть полностью неактивной. Определение состояния инактивации X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека (ПСК) является непростой и актуальной задачей, однако, различные методы определения состояния инактивации зачастую приводят к противоречивым результатам. В клинических лабораториях широко используется метод анализа метилирования гена *AR*, который позволяет определить соотношение аллелей инактивированной X-хромосомы в клетках крови и тканях пациентов. Также этот метод ранее был предложен для определения статуса инактивации в ИПСК человека. В данной работе мы проанализировали состояние инактивации X-хромосомы в линии ИПСК человека стандартными методами: экспрессия гена *XIST*, метилирование промотора *XIST*, модификации гистонов и др., а также по уровню метилирования гена *AR* с фрагментным анализом. Мы выяснили, что метилирование локуса *AR* не коррелирует с состоянием инактивации X-хромосомы в женских ИПСК. Таким образом, мы предполагаем, что этот маркерный ген не может служить индикатором инактивации X-хромосомы в женских линиях ИПСК человека.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НЕОНАТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ИЗУЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Александра Витальевна Панова^{1,2}, Наталья Владимировна Клементьева¹, Анатолий Николаевич Тюльпаков¹, Сергей Львович Киселёв^{2,1}

¹ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия;

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва, Россия

a.v.panova@mail.ru

Дефекты гена инсулина (INS) являются одной из причин возникновения сахарного диабета у детей первого года жизни (неонатальный сахарный диабет). Мутации, приводящие к гиперинсулинемии, как правило, гетерозиготны. Причины возникновения абсолютного дефицита инсулина при гетерозиготной мутации до сих пор не ясны. Несмотря на наличие одного нормального аллеля гена инсулина, заболевание проявляется не просто сниженным уровнем инсулина в крови, а его абсолютным дефицитом. Результаты малочисленных работ по изучению последствий мутаций гена INS, проведенных в основном на мышах и клеток линии HEK293, противоречивы и не всегда отражают процессы патогенеза в поджелудочной железе человека. Понимание причин и механизмов развития заболевания поможет выбрать оптимальный подход для прогноза и терапии заболевания.

Для создания модели заболевания мы получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) путём репрограммирования фибробластов кожи пациента с диагнозом неонатальный диабет с гетерозиготной мутацией с.188-31 G>A в гене инсулина (INS). Полученные ИПСК были охарактеризованы на маркеры

плюрипотентности, возможности дифференцироваться в клетки трёх зародышевых листков и наличие мутации. Далее, применяя технологию геномного редактирования с использованием CRISPR-Cas9, в полученных ИПСК была исправлена гетерозиготная мутация в гене инсулина, и получена система двух изогенных линий: с мутацией и без. Клеточные линии были дифференцированы в энтодермальном направлении с целью получения инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы. Полученные клетки экспрессировали маркеры предшественников клеток поджелудочной железы PDX1, NKX6.1, NEUROG3, а также инсулин и глюкагон.

В дальнейшем планируется отработка протокола дифференцировки и получение зрелых инсулин-продуцирующих β -клеток и подтверждение исправления мутации на уровне РНК и белка в полученной изогенной системе, что позволит изучить механизм патогенеза заболевания на молекулярном и клеточном уровне, и разработать фармакологические или клеточные подходы по персонализированной терапии моногенного сахарного диабета.

СОДЕРЖАНИЕ БИЛИРУБИНА В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

**Ина Георгиевна Панова¹, Юлия Вячеславовна
Сухова², Александр Сергеевич Татиколов³,
Римма Алексеевна Полтавцева², Татьяна
Юрьевна Иванец², Геннадий Тихонович Сухих²**

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия;

² Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия;

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
РАН, Москва, Россия

pinag@mail.ru

Введение. Стекловидное тело (СТ) является внутренней средой (внеклеточным матриксом) глаза позвоночных и расположено между сетчаткой и хрусталиком. Главными компонентами СТ являются гиалуроновая кислота и коллаген, а также белки, аминокислоты, электролиты, аскорбиновая кислота, биологически активные молекулы. СТ осуществляет транспорт метаболитов к внутренним частям глаза для поддержания их жизнедеятельности и функции, в особенности хрусталика, который полностью лишен кровеносных сосудов. Особый интерес представляет молекулярный состав СТ в период раннего пренатального развития, что связано с активным морфогенезом и биохимическими изменениями качественного и количественного состава его компонентов. Важнейшей характеристикой СТ в раннем развитии является регрессия гиалоидных сосудов. Мы предположили, что гибнущие эритроциты могут быть источником билирубина в СТ, что определило **цель** настоящего исследования — провести анализ на присутствие в развивающемся СТ билирубина.

Материал и методы. Исследовали СТ глаз плодов человека с 17 по 31 нед., полученных на аутопсии по медицинским показаниям. Возраст плодов соответствует срокам, установленным врачом-акушером. Образцы СТ центрифугировали при 12500 об/мин, erpendorf centrifuge 5417R, 4°C, 30 мин. Содержание билирубина в супернатантах СТ измеряли на клиническом биохимическом анализаторе BA-400 (BioSystems S.A., Испания).

Результаты. Измерения с 17 по 31 нед показало присутствие билирубина в СТ на всех исследованных

стадиях. С 17 по 19 нед концентрация билирубина в среднем составляла 8.67 mmol/L, что в 6,3 раза превышало концентрацию с 20 по 31 нед., которая составляла в этот период в среднем 1.37 mmol/L.

Вывод. Содержание билирубина в СТ не противоречит нашему предположению о возможной связи с регрессией гиалоидных сосудов и гибелью эритроцитов. Образовавшийся билирубин, по всей вероятности, связывается с альбумином СТ и, обладая свойствами антиоксиданта, наряду с другими антиоксидантами предохраняет СТ, сетчатку и хрусталик от свободно-радикальных процессов, обусловленных кислородом из гиалоидных сосудов.

Работа проведена в рамках Госзадания № 0108-2019-0005 (ИБР РАН) и № 001201253314 (ИБХФ РАН).

КАТЕХОЛАМИНЫ В ТКАНЯХ ГЛАЗА В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ЧЕЛОВЕКА

**Ина Георгиевна Панова¹, Мария Дмитриевна
Чибирева¹, Римма Алексеевна Полтавцева²**

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия;

² Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

pinag@mail.ru

Введение. Катехоламины участвуют в метаболизме различных органов и тканей. Они являются нейротрансмиттерами, широко распространены в организме и играют важную роль в центральной нервной системе. Взаимодействие между нейротрансмиттером и рецептором является одним из главных путей коммуникации нейронов. Физиологические эффекты катехоламинов обусловлены их способностью связываться со специфическими рецепторами, расположенными на мембране эффекторных клеток. Катехоламины дофамин (ДА), норадреналин (НА), адреналин (А) хорошо исследованы в сетчатке глаза взрослых млекопитающих. ДА и А связаны с амакриновыми нейронами, которые участвуют в зрительном процессе. ДА участвует в перестройке сетчатки из состояния темновой адаптации в состояние световой адаптации. НА связан с симпатическими нервами, которые иннервируют сосуды сетчатки. Представляет интерес исследовать катехоламины в сетчатке и других тканях глаза в пренатальном развитии человека.

Целью работы было провести анализ тканей глаза человека в пренатальном развитии на присутствие в них катехоламинов.

Материал и методы. Катехоламины ДА, НА, А и их предшественник — аминокислоту ДОФА определяли в тканях глаза у 17 и 18 нед. плодов методом ВЭЖХ. Измерения проводили в сетчатке, ретинальном пигментном эпителии (РПЭ), в радужке+цилиарное тело, хрусталике, стекловидном теле и роговице.

Результаты. У 17 и 18 нед. плодов человека в сетчатке, РПЭ, стекловидном теле и роговице были обнаружены ДА, НА, А и ДОФА. В радужке+цилиарное тело были обнаружены ДА, НА и ДОФА. В хрусталике присутствовали ДА и ДОФА. Вывод. На исследованных стадиях продолжается рост и дифференцировка структур глаза. В сетчатке продолжается процесс дифференцировки нейронов, рост аксонов, формирование синаптических связей. Продолжается рост ретинальных сосудов. РПЭ обеспечивает стабильность и питание сетчатке. Стекловидное тело участвует в метаболизме сетчатки и хрусталика. В цилиарном теле увеличивается глубина

складок цилиарных отростков и формируется строма. Продолжается дифференцировка радужки, хрусталика и роговицы. Катехоламины, которые были обнаружены в этих тканях, являются необходимым компонентом для установления морфофункциональных связей в развивающейся сетчатке и в других исследованных структурах глаза. Известно также, что катехоламины обладают антиоксидантными свойствами и таким образом обеспечивают необходимую защиту как нейронам сетчатки, так и клеткам других тканей развивающегося глаза.

Работа проведена в рамках Госзадания № 0108-2019-0005.

ВОЗМОЖНЫЙ ПУТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ НОРМОТЕНЗИВНОЙ ГИДРОЦЕФАЛИИ

**Н.М. Парамонова¹, Г.В. Гаврилов²,
Б.А. Парамонов², А.О. Шпаков¹**

¹ ФГБУН «Институт Эволюционной Физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБ ВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

natara@bk.ru

Гидроцефалия — патологическое состояние, сопровождающееся избыточным скоплением церебральной жидкости в желудочках головного мозга, обусловленное дисбалансом между продукцией ликвора и его резорбцией, вызывающим расширение желудочковой системы и компрессию мозгового вещества. Среди причин числятся травматическое повреждение мозга, нейроинфекции, опухоли головного мозга. Этиология идиопатической нормотензивной гидроцефалии (иНТГ), при которой развивается триада Хакима–Адамса (деменция, нарушение походки, тазовые расстройства), остается окончательно нераскрытой. С целью уточнения дифференциальной диагностики с заболеваниями, имеющими сходные клинические признаки (вторичная НТГ, хроническая окклюзионная гидроцефалия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, и др. цереброваскулярные болезни), исследовали ультраструктуру биоптатов мозга из перивентрикулярной зоны головного мозга, полученные в ходе вентрикулошунтирующей операции.

На фоне общей пастозности вещества мозга, обусловленной множеством расширенных отростков, диффузно расположенных в нейропиле, обнаружены морфологические признаки нарушений гематоэнцефалического барьера и расширение межклеточного пространства. Среди нервных и глиальных клеток с различной степенью деструкции, от минимально проявленной до изменений дегенеративного характера, включая некроз, аутолиз, апоптоз, наблюдали клетки с «потерей» цитоплазмы на треть, половину, а иногда и полностью — до «оголения» ядер при абсолютной их морфологической и, возможно, функциональной сохранности. Чаще среди них определялись олигодендроциты. При этом характер хроматина в кариоплазме, его структурированность, имел тенденцию перехода от гетерохроматиновых конденсатов вблизи кариолеммы к преобладанию эухроматина. Такие ядра имели идеально округлую, редко овальную форму, в отличие от погибающих клеток с извилистым контуром ядра. Не редко встречали небольшие клетки с гомогенной кариоплазмой и малым количеством цитоплазмы, содержащей единичные оргanelлы (чаще всего мелкие митохондрии).

На наш взгляд, это — явление дедифференцировки, «переформатирования» клеток нервной ткани путем «сбрасывания» деструктивно измененной цитоплазмы, сопровождающегося реструктуризацией хроматина, по-прежнему содержащего всю генетическую информацию данного организма. Сигналы для вторичной дифференцировки эти клетки получают при мембранных контактах от соседних сохранных нейронов и/или глиальных клеток. Известны попытки экспериментального переформатирования клеток путем искусственной дедифференцировки с целью генетической и клеточной терапии. Наблюдаемый нами процесс — естественный и, по-видимому, носит адаптационный характер при иНТГ. Подтверждение и изучение данного феномена требует дальнейших исследований.

ГОМЕОБОКС-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ PREP1 И MEIS В КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ

Дмитрий Николаевич Пеньков¹, Елена Викторовна Парфенова¹, Всеволод Арсеньевич Ткачук^{1,2}

¹ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

dpenkov@yahoo.com

Транскрипционные факторы семейства TALE (Prep, Pbx, Meis) являются ключевыми регуляторами функционирования, роста и дифференцировки клеток.

Наряду с исследованиями биохимических свойств этих факторов, нами была установлена роль Prep1, Meis1, Meis2, Pbx1, Pbx2 в различных биологических процессах. С помощью ChIP-seq анализа были определены профили и сайты связывания TALE факторов с ДНК, установлены общие для различных клеток их гены-мишени. Набор генов-мишеней позволил определить уникальные роли этих факторов в клеточных процессах.

Нами была изучена роль фактора Prep1 и Meis в адипоцитарной дифференцировке. Установлено, что Prep1 необходим для поддержания мезенхимальных стромальных клеток в недифференцированном состоянии.

В наших работах с использованием ATAC-seq анализа было убедительно показано, что Prep1 обладает уникальной способностью связываться с хроматином в «закрытой» конфигурации, т.е. выступать в роли «пионерного» фактора. В частности, в клетках преадипоцитов приблизительно половина сайтов связывания Prep1 приходится на локусы, недоступные для прямого взаимодействия с белками. Механизм этого связывания не исследован, однако анализ сайтов связывания с ДНК говорит о взаимодействии Prep1 с дополнительными ДНК-связывающими белками, возможно, с образованием комплексов.

Наши недавние исследования показали, что Prep1 необходим для процессов дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток (МСК). МСК представляют собой высокогетерогенную клеточную популяцию, в которой отсутствуют молекулярные маркеры для идентификации суб-популяций стромальных стволовых клеток и их предшественников. С использованием технологии RNA-seq одиночных клеток и МСК, полученных из костного мозга мышей с пониженным уровнем экспрессии Prep1 (гипоморфных мышей), нами было показано, что Prep1 необходим для поддержания остеоген-специфических МСК, так как в МСК из Prep1 гипоморфных мышей количество этих клеток значительно уменьшено.

Исследования по *ex vivo* дифференцировке МСК в остеобласты подтверждают эти выводы. Биоинформационный анализ данных RNA-seq одиночных клеток позволил нам определить основные молекулярные пути с участием *Rarg1* во время функционирования и дифференцировки клеток мезенхимальных стромальных клеток.

Таким образом, факторы TALE необходимы для процессов дифференцировки клеток, а также для поддержания их в недифференцированном состоянии. Набор факторов, а также механизм их действия в этих процессах уникальны.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-29-04112 мк.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ АЛКОКСИАРИЛПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛИНА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ БЕЛОК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ p53-МДМ2

Николай Викторович Первушин¹, Даниил Романович Базанов², Виктория Юрьевна Савицкая², Лада Владимировна Аникина³, Марина Валентиновна Проскурнина^{2,3}, Наталья Александровна Лозинская^{2,3}, Гелина Сергеевна Копейна¹

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

rhododendron.nick@mail.ru

Ингибирование белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 является перспективным направлением в терапии онкологических заболеваний для элиминации опухолевых клеток, сохраняющих p53 дикого типа. Белок p53, обеспечивающий стабильность генома и генетическую однородность клеток, выполняет функцию онкосупрессора, активируясь под действием различных стрессовых стимулов, и является важнейшим медиатором ареста клеточного цикла, старения и апоптоза. В норме в клетках наблюдается низкий уровень p53 за счет его постоянной протеасомной деградации под действием убиквитин-лигазы MDM2. Примером соединений, обеспечивающих эффективное блокирование взаимодействия MDM2 с p53 и ведущих к повышению концентрации p53 в клетках, являются нутлины, представляющие собой имидазолиновые производные.

В настоящей работе была исследована биологическая активность алкоксиарилпроизводных имидазолина как в сравнении с фрагментом молекулы нутлина (4-SI арилпроизводное), так и с полной молекулой нутлина-3а. Молекулярный докинг показал, что орто- и парапроизводные имидазолина (4-MeO, 2,4-diMeO, 4-EtO) могут эффективно связываться с белком MDM2 в сайте, отвечающим за взаимодействие с p53. Исследования биологической активности проводились на клеточных линиях аденокарциномы легкого A549 и колоректального рака RKO при помощи методов вестерн-блот анализа и проточной цитофлуориметрии. Наиболее эффективно на клетки линии A549 действовало 2,4-diMeO производное, увеличивая уровень p53 в 3.4 раза по сравнению с контролем, при этом остальные соединения также показали максимальную эффективность при концентрации 20 мкМ. Результаты на линии RKO подтвердили

эффективность действия 2,4-diMeO, обработка клеток которым вела к увеличению уровня p53 в 2.8 и 3.8 раза при концентрациях 10 и 20 мкМ, соответственно.

В результате анализа клеточной гибели на линии A549 было выявлено, что 4-MeO и 2,4-diMeO практически не стимулировали индукцию апоптоза или некроза в концентрациях вплоть до 80 мкМ, что аналогично действию нутлина-3а, который вызывает апоптоз на линии A549 только в сочетании с ДНК-повреждающими агентами. Напротив, использование 4-EtO вело к значительной некротической гибели клеток в концентрациях свыше 20 мкМ, что свидетельствовало об его неспецифической токсичности.

Таким образом, результаты исследования продемонстрировали наличие способности увеличивать уровень p53 в опухолевых клетках у алкоксиарилпроизводных имидазолина.

Работа поддержана грантами РФФИ (17-75-20102) и РФФИ (17-03-01320).

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ LMNA МУТАЦИЙ НА СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH В МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В ХОДЕ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Ксения Игоревна Перепелина^{1,2}, Полина Евгеньевна Клаузен^{2,3}, Анна Александровна Костарева^{1,2}, Анна Борисовна Малашичева¹⁻³

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Россия;

² Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

perepelina.kseniya93@gmail.com

Ядерные ламины А типа участвуют во многих клеточных процессах благодаря своей способности взаимодействовать с хроматином и факторами транскрипции, и, таким образом, влиять на их свойства. Мутации в гене *LMNA*, кодирующего ламин А, приводят к развитию тяжелых наследственных заболеваний — ламинопатий, при которых повреждаются различные ткани мезенхимного происхождения. Точечные мутации R527C и R471C в *LMNA* связаны с развитием мандибулоакральной дисплазии, расстройством, характеризующимся выраженным нарушением остеогенной дифференцировки. Каким образом ламин А регулирует экспрессию генов и дифференцировку клеток остается в значительной степени не изучено. Одним из основных регуляторов, определяющих судьбу клеток в ходе эмбрионального развития и в постнатальный период, является сигнальный путь Notch.

Цель исследования заключалась в изучении влияния тканеспецифичных *LMNA* мутаций, связанных с мандибулоакральной дисплазией, на процесс остеогенной дифференцировки и активность сигнального пути Notch в клетках мезенхимного происхождения.

Были использованы лентивирусные конструкции, несущие *LMNA* R527C и *LMNA* R471C мутации; исследовано их влияние на активность сигнального пути Notch в четырех типах мезенхимных клеток человека (HUVEC, HCMC, HSMC и HAVIC) в процессе остеогенной дифференцировки. Сигнальный путь Notch активировали путем введения Notch-активированного домена (NICD) на лентивирусном носителе. Оценку экспрессии остеогенных маркеров и ключевых Notch генов проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Мы наблюдали широкий диапазон уровней экспрессии генов, связанных с Notch, между различными типами мезенхимных клеток, несущих *LMNA R527C* и *LMNA R471C*, при базовом уровне активности сигнального пути Notch (без введения NICD). Далее, мы показали, что при активации Notch *LMNA R527C* оказывает строго противоположный эффект в двух типах мезенхимных клетках (НСМС и НАВИС) на остеогенную дифференцировку и активность Notch.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что действие *LMNA R527C* и *LMNA R471C* мутаций на сигнальный путь Notch носит строго тканеспецифичный характер. Наиболее яркий эффект данные мутации оказывают на НСМС и НАВИС. Изменчивость экспрессии Notch-зависимых генов и остеогенных маркеров способствует пространственной регуляции взаимодействия ламина А с хроматином, что может являться значимым фактором в определении судьбы клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-015-00313.

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОДХОД К МАКСИЛЛЯРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ЧЕЛЮСТНОГО ГРЕБНЯ В СВЕТЕ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТОЛОГИИ

Марина Дмитриевна Перова¹, Владимир Борисович Карпюк², Ирина Валериевна Гилевич², Владимир Алексеевич Порханов^{1,2}, Игорь Александрович Севостьянов¹, Илья Игоревич Федоров¹

¹ Кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия;

² Лаборатория разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия

mpereva2013@yandex.ru

Цель. Оценить активность формирования и морфофункциональную ценность опорных структур для дентальных имплантатов после стимулированной трехмерной реконструкции максиллярного челюстного гребня.

Материалы и методы. В исследование вошли 20 пациентов (12 муж., 8 жен.) в возрасте от 57 до 78 лет; из них, тестовая группа (ТГ) — 11 человек, с применением стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ-ЖТ), контрольная группа (КГ) — 9. Выполнено 36 операций трехмерной реконструкции верхней челюсти (19 в ТГ; 17 в КГ), включающих латеральный синус-лифтинг, вертикальную и горизонтальную аугментацию гребня с фиксированными кортикальными каркасами и установкой через 4–6 месяцев 114 дентальных имплантатов (64 в ТГ; 50 в КГ). СВФ-ЖТ выделяли из липоаспирата ферментативным методом по протоколу выделения клеток в лаборатории клеточных технологий.

Результаты. Подтвержден прямой антибактериальный эффект СВФ-ЖТ (иммуномодулирование, ранняя реперфузия трансплантата): вероятность утраты трансплантата при инфицировании (расхождение швов) в 7 раз ниже (ОР 0,143; 95%ДИ 0,022–0,922; $p < 0,05$). Документировано превышение в ТГ объема новой опорной кости на 40% ($p < 0,001$) на счет

более активного и продуктивного остеогистогенеза. Относительная площадь витальной минерализованной ткани в 1,7 раза больше в ТГ ($p < 0,01$), невитальной минерализованной ткани — в 1,9 раза меньше в ТГ ($p < 0,01$), имеется тенденция к снижению количества зон фиброзного костного мозга со статистически незначимой разницей с КГ в 7,3% ($p > 0,05$). В сроки до 5 лет риск потери дентального имплантата из-за проблем с опорной костью в 11 раз меньше в ТГ (ОР 0,099; 95%ДИ 0,013–0,761; $p < 0,05$).

Заключение. Применение СВФ-ЖТ повышает эффективность реконструкции кости, значимо увеличивая размеры альвеолярного гребня с оптимальными морфологическими характеристиками, минимумом осложнений, обеспечивает долговременное функционирование протетических реставраций с опорой на дентальные имплантаты.

ВЛИЯНИЕ ЛИМФОИДНОЙ ОПУХОЛИ, НЕ ЗАТРАГИВАЮЩЕЙ КОСТНЫЙ МОЗГ, НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Наталья Арнольдовна Петинати, Наталья Владимировна Сац, Нина Иосифовна Дризе, Николай Михайлович Капранов, Юлия Олеговна Давыдова, Екатерина Александровна Фастова, Аминат Умаросхабовна Магомедова, Сергей Кириллович Кравченко, Валерий Григорьевич Савченко

ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

loel@mail.ru

Наличие опухоли в организме вызывает воспалительный процесс. Воспаление связано с релизом множества факторов, которые могут активировать клетки стромального микроокружения костного мозга (КМ) в частности мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), участвующие в регуляции кроветворения. У больных диффузной В клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) без вовлечения КМ изменены основные свойства МСК. Показано, суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа выше у пациентов, чем у доноров соответствующего возраста. В МСК больных повышена экспрессия FGF2, FGFR2, IL6, IL8 и других генов. Было предположено, что в плазме больных содержатся растворимые факторы влияющие на свойства МСК и их активацию у пациентов. Проверка этой гипотезы стала целью данного исследования.

МСК 5 здоровых доноров (2 муж. /14 и 25 лет/ и 3 жен. /19, 34 и 40 лет/ культивировали 10 дней в бессывороточной среде в присутствии 5% плазмы 5 здоровых доноров (1 муж. 34 года, 4 жен. /34, 40, 59 и 66 лет/) и плазмы 11 больных ДВККЛ до и через месяц после окончания лечения. Анализировали экспрессию поверхностных маркеров (СУФ) и относительный уровень экспрессии (ОУЭ) некоторых генов.

Показано, что добавление образцов плазмы влияет на экспрессию поверхностных маркеров МСК (СУФ CD105 — снизился в 3 раза, CD146 — в 2 раза и СУФ CD54 (ICAM1), и доля МСК, экспрессирующих эту молекулу адгезии для лимфоцитов, повысились в 2 раза) в МСК культивированных с плазмой больных по сравнению с добавлением плазмы доноров. ОУЭ гена ICAM1 повысился, а генов *PDGFRa* и *PDGFRb* снизился. Изменения экспрессии РНК и поверхностных белков

при культивировании МСК здоровых доноров с плазмой больных аналогичны изменениям в МСК самих пациентов. Не выявлено разницы между эффектами плазмы первичных больных и через месяц после окончания лечения, за исключением повышения ОУЭ *SDF1*, отвечающего за хоминг кроветворных клеток в КМ, после лечения. МСК здоровых доноров-мужчин гораздо менее чувствительны к плазме больных, чем МСК женщин. Возможно, это связано с возрастом доноров. Чем старше донор МСК, тем эти клетки более чувствительны к факторам секретируемым опухолью. Это подтверждается и тем, что ДБККЛ наиболее часто болеют люди пожилого возраста (медиана 53 года).

Таким образом, опухоль не взаимодействуя непосредственно с МСК в КМ оказывает системное действие на клетки поддерживающие и регулирующие кроветворение через растворимые факторы. Природа этих факторов должна стать предметом дальнейшего изучения.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИСФОСФОНАТ-ОКТАКАЛЬЦИЕВЫЙ ФОСФАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Наталья Валерьевна Петракова¹, Екатерина Алексеевна Кувшинова², Ирина Константиновна Свиридова², Ярослав Дмитриевич Шанский², Наталья Сергеевна Сергеева², Владимир Сергеевич Комлев¹, Сергей Миронович Баринов¹

¹ *Институт металлургии и материаловедения РАН им. А.А. Байкова, Москва, Россия;*

² *Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, Россия*

petrakova.nv@mail.ru

Адресная доставка химиопрепаратов в зону опухолевого поражения совместно с имплантацией остеопластического материала служит одновременно для облегчения регенерации костной ткани и подавления опухолевого роста в зоне дефекта. Настоящая работа направлена на создание функционально-ориентированных материалов на основе октакальциевого фосфата (ОКФ), биоматериала нового поколения, обладающего высокой скоростью резорбции и остеокондуктивными свойствами. Высокоразвитая поверхность кристаллов ОКФ пластинчатой морфологии и их ориентация относительно друг друга, определяет высокие адсорбционные свойства составленных из него пористых керамических скэффолдов, предназначенных для остеопластики.

В настоящей работе в качестве лекарственного компонента использовали препарат из группы бисфосфонатов, золендроновую кислоту. Бисфосфонаты относят к препаратам комплексного действия: антирезорптивного, ингибирующего гиперактивность остеокластов при остеолитических процессах в костной ткани, а также — прямого противоопухолевого, индуцирующего апоптоз опухолевых клеток. Эффективность лечения патологий костной ткани бисфосфонатами с химической точки зрения обусловлена высокой степенью их связывания с кристаллами фосфатов кальция. Наличие двух фосфоновых групп в их структуре обеспечивает химическое взаимодействие с гидроксильными группами гидроксиапатита кости с образованием хелатных комплексов. Кроме этого, допирование бисфосфонатами костных имплантатов улучшает интеграцию материала с костной тканью реципиента на границе дефекта.

В результате проведенной работы получена функционализированная ОКФ-керамика препаратом из группы бисфосфонатов, золендроновой кислотой, в зависимости от условий насыщения: концентрации растворов, кислотности среды, времени инкубации; исследована кинетика выхода препарата в модельную среду. Показано, что после выдержки ОКФ-керамики в растворе золендроновой кислоты, на ее поверхности образуется новая фаза, отличающаяся по морфологии от исходной. Установлено, что высвобождение золендроновой кислоты из ОКФ происходило в незначительных количествах и связано лишь с процессами гидролиза/растворения поверхностных слоев ОКФ при выдержке в модельном КФ буферном растворе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11052.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МСК В НЕРВНОМ СТОЛЕ КРЫСЫ-РЕЦИПИЕНТА В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ СУБПЕРИНЕВРАЛЬНОЙ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ В ПОВРЕЖДЕННЫЙ СЕДАЛИЩНЫЙ НЕРВ

Елена Сергеевна Петрова¹, Елена Николаевна Исаева², Елена Андреевна Колос¹, Дмитрий Эдуардович Коржевский¹

¹ *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;*

² *ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия*

iemmorphol@yandex.ru

Мезенхимные стволовые клетки костного мозга (МСК) широко используются в экспериментальных исследованиях в области регенеративной медицины. Показано, что применение МСК может способствовать осуществлению репаративных процессов в поврежденных органах и тканях. Целью данного исследования явилось выяснение судьбы МСК костного мозга крысы после их аллотрансплантации в поврежденный седалищный нерв. МСК костного мозга крыс Вистар-Киото были получены в ООО «Транстехнологии» (руководитель к. б. н. Д.Г. Польшинцев). Перед трансплантацией МСК культивировали и метили бромдезоксигуанидином (BrdU). Седалищные нервы взрослых крыс Вистар-Киото (n=18) были повреждены в области верхней трети бедра путем наложения лигатуры в течение 40 с. Суспензию меченных BrdU МСК вводили субпериневрально в нерв крысы-реципиента (5×10^4 клеток в 5 мкл на животное). Показано, что через 5–7 сут. после операции отдельные BrdU-содержащие МСК обнаруживаются в толще нерва, а также в его эпиневральной и периневральной оболочках. Вероятно, пересаженные в эндоневрий клетки мигрируют во внешние оболочки по сосудам поврежденного нерва. В соединительнотканной эпиневральной оболочке МСК локализуются вблизи кровеносных сосудов и в области жировой клетчатки. В жировой клетчатке эпиневрия можно видеть отдельные меченые BrdU адипоциты. Кроме того, оказалось, что часть пересаженных BrdU⁺ МСК трансдифференцируются в клетки периневрия. Вероятно, этому способствует наличие в составе периневрия таких белков внеклеточного матрикса, как ламинин, фибронектин, коллаген и др. Выявление пересаженных клеток в эпи- и периневрии послужило поводом

для сравнительного изучения оболочек в двух группах экспериментальных животных: с поврежденным нервом и нервом с повреждением и введением МСК. Измерение толщины периневральной и эпиневральной оболочек нерва-реципиента через три недели после операции показало, что клеточная терапия приводит к увеличению их толщины приблизительно в полтора раза по сравнению с поврежденным нервом.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ТОНКОПЛЁНОЧНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

Сергей Владимирович Пинчук¹, Ирина Борисовна Василевич¹, Александр Николаевич Красковский², Ксения Сергеевна Гилевская², Владимир Енокович Агабеков², Игорь Дмитриевич Волотовский¹

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

² Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

pinchuksv@mail.ru

Актуальной задачей регенеративной медицины является создание тканеинженерных конструкций на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК), для восстановления поврежденных тканей и органов человека, что обуславливает необходимость поиска биосовместимых соединений, выполняющих роль матрицы-носителя для клеточного компонента. Целью данного исследования являлось изучение адгезии, жизнеспособности, внутриклеточного содержания активных форм кислорода (АФК), иммунофенотипа МСК из жировой ткани человека при их взаимодействии с 4 бислойными пленками, содержащими в качестве поликатиона хитозан или полиэтиленимин (ПЭИ), а в качестве полианиона — пектин цитрусовый, сульфатированный декстран или карбоксиметилцеллюлозу.

Проведенные исследования показали, что МСК эффективно адгезируют на поверхности тонкопленочных носителей, в которых в роли поликатиона использовался хитозан, а на поверхности ПЭИ содержащих пленок способность клеток к адгезии снижается. Критерием эффективности адгезии МСК служило наличие в культуре клеток фибробластоподобной формы через сутки после культивирования на носителях. Так на хитозан-содержащих пленках МСК были представлены клетками, имеющими фибробластоподобную форму, тогда как в случае ПЭИ в культуре преобладали клетки округлой формы. Окрашивание флуоресцеин диацетатом и пропидиум иодидом через 5 суток культивирования показало низкое содержание в культуре клеток в состоянии некроза (3–5%) на хитозан-содержащих пленках и значительно более высокое (40–80%) на ПЭИ-содержащих. Установлено, что после инкубации МСК (2 ч) на поверхности носителей, к которым они проявляют сниженную способность к адгезии (ПЭИ-содержащие пленки) в клетках регистрируется более высокая интенсивность флуоресценции зонда 5-(6)-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата по сравнению с хитозан-содержащими пленками. Это свидетельствует о росте в клетках содержания АФК, что может лежать в основе низкой адгезии и жизнеспособности МСК на данных носителях. Однако

добавление в среду инкубации антиоксидантов (эмоксипин, кверцетин) не влияло на адгезию МСК, что позволяет предполагать отсутствие токсического влияния ПЭИ-содержащих носителей на клетки. Кроме этого установлено снижение экспрессии CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 и увеличение CD34 в МСК после культивирования на ПЭИ-содержащих пленках (1 сутки). Это указывает на изменение в МСК состава поверхностных белков и, вероятно, является результатом реакции клеток на дефицит субстрата для рецепторов адгезии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Наталья Николаевна Пискунова¹, Евгений Евгеньевич Кудрявицкий², Евгений Дмитриевич Григорьевский³, Елизавета Игоревна Сафронова⁴, Сергей Сергеевич Дыдыкин¹, Степан Иванович Кольченко¹, Ольга Александровна Романова⁵, Андрей Александрович Пантелеев⁵, Елизавета Александровна Воробьева⁶

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.М. Буянова» ДЗМ, Москва, Россия;

³ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия;

⁴ НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия;

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия;

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского, Москва, Россия

natalia.piskunova2015@yandex.ru

Цель: разработать экспериментальную модель для изучения регенерации слизистой оболочки трахеи в условиях минимально инвазивной методики фиксации тканеинженерного матрикса на поврежденном участке трахеи и бронхов.

Материалы и методы. Данная работа проводилась в два этапа. На первом этапе животной моделью являлись кролики породы Chichilla весом около 4 кг. Было сформировано 5 групп с различными типами оперативных вмешательств. 1 группа — реваскуляризация трахеи, частично по методу Hardillo и соавт. (2001). 2 группа — нанесение дефекта слизистой оболочки и подслизистой основы трахеи (половина длины окружности трахеи в ширину, 1,5 см в глубину); 3 группа — закрытие дефекта путем подшивания матрикса на основе хитозана и коллагена с расширенным доступом в трахею; 4 группа — фиксация матрикса в просвете трахеи при помощи сосудистого стента. На втором этапе в качестве животной модели использовали свиней породы Sus scrofa domesticus. Сначала формировали посттравматическую стриктуру левого главного бронха путем формирования дефекта слизистой оболочки, включая надхрящницу. Затем формировался дефект слизистой оболочки, который покрывался тканеинженерным матриксом и фиксировался с помощью нитинового стента. Все операции выполнены бронхоскопически в условиях общей анестезии с использованием искусственной вентиляции легких.

Результаты. Для кроликов критический дефект составляет не менее 1,5 см в длину и не менее 50% окружности трахеи. Оптимальный метод фиксации матрикса на месте дефекта — стент. Он плотно прилежит к стенке трахеи и препятствует образованию экссудата между дефектом и матриксом, что способствует регенерации. Микроскопически — множественные зоны, где уже началась регенерация подслизистого слоя, по краям дефекта видна регенерация эпителия. Использование бронхоскопической методики снижает травматичность данного вмешательства, уменьшает продолжительность послеоперационного периода и обеспечивает более быстрое восстановление.

Выводы. Предложенная экспериментальная модель позволяет моделировать различные повреждения верхних дыхательных путей и способы их лечения. Фиксация матрикса в просвете трахеи с помощью стента — наиболее оптимальный метод, осуществимый бронхоскопически. Данная методика потенциально применима в других полых органах и структурах при правильном подборе стента и синтетического материала.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМБАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК КРОЛИКА *IN VITRO*

Галина Алексеевна Писугина^{1,2}, Ольга Игоревна Александрова², Юлия Игоревна Хорольская², Кирилл Эдуардович Журенков^{1,2}, Дарья Александровна Переплетчикова², Татьяна Вячеславовна Машель², Миральда Ивановна Блинова²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

rga120794@gmail.com

Лимбальная недостаточность (ЛН) — серьезное заболевание, которое приводит к потере прозрачности роговицы (её воспалению, васкуляризации и возникновению бельма). Лимбальные стволовые клетки (ЛСК) — пул восстановления эпителия роговицы — расположены в складках лимба, который является границей между конъюнктивой и роговицей. При потере функциональности ЛСК развивается ЛН. Консервативные методы лечения не всегда помогают добиться восстановления функции роговицы. Таким образом, одной из актуальных задач регенеративной офтальмологии на данный момент является разработка биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе ЛСК. При клиническом использовании БМКП требуется идентификация используемой клеточной линии. Основным вопросом этой работы стало выделение и исследование культуры ЛСК кролика.

Полученная популяция изначально имела смешанный фенотип — была представлена клетками как эпителиального, так и мезенхимного типов, но в ходе культивирования постепенно приобрела гомогенный мезенхимный состав. Мы показали, что выделенная культура ЛСК способна к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном и эпителиальном направлениях. Было показано наличие экспрессии как стволовых маркеров в культуре ЛСК, так и эпителиальных — цитokerатинов. Полученные данные в совокупности позволяют предположить, что культура ЛСК в ходе пассажей претерпевает изменения, описанные в литературе как частичный эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП).

ПРИМЕНЕНИЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА У ЖИВОТНЫХ *IN VIVO*

Анна Олеговна Пищелко¹, Михаил Васильевич Светлик¹, Николай Михайлович Немирович-Данченко¹, Марина Станиславовна Кудобаева¹, Татьяна Викторовна Ананьина¹, Яна Александровна Тюменцева¹, Анна Владимировна Наумова^{1,2}, Марина Юрьевна Ходанович¹

¹ Лаборатория нейробиологии, НИИ биологии и биофизики, Томский государственный университет, Томск, Россия;

² Department of Radiology, University of Washington, Seattle, WA, USA

bio_1979@mail.ru

Нейрогенез активно изучается как эндогенный процесс регенерации при ряде заболеваний мозга, таких как ишемия головного мозга, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона и др. Возможность терапевтического восстановительного воздействия на пораженные заболеванием участки мозга напрямую зависит от понимания биологии клеток, участвующих в нейрогенезе, но их изучение *in vivo* затруднено. Сравнительно недавно описан метод неинвазивного изучения нейрогенеза на животных *in vivo* посредством маркирования клеток, определяющих нейрогенез, — предшественников нейронов, векторами, несущими трансген ферритина, в результате чего нейрогенез может быть визуализирован при помощи МРТ. В данном исследовании были проверены на эффективность трансфекции *in vivo* на здоровых крысах линии SD несколько векторов на основе лентивируса (LV) и аденоассоциированного вируса (AAV). Вектор на основе LV включал два трансгена под контролем промотора даблкортина (DCX), специфического для предшественников нейронов: последовательность тяжелой цепи человеческого ферритина и зеленого флуоресцентного белка (GFP). Так же тестировали два вектора на основе AAV с разными трансгенами — с GFP под промотором DCX и с FerrH так же подпромотором DCX. Векторы вводили путем стереотаксических инъекций в нейрогенную субвентрикулярную зону вблизи боковых желудочков головного мозга. В контралатеральное полушарие, которое использовали в качестве контроля, вводили фосфатный буфер. На третьи сутки после инъекции анализировали срезы, окрашенные методом флуоресцентной ИГХ с антителами к DCX и FerrH. Эффективность трансфекции молодых нейронов определяли как процент площади колокализации сигналов DCX и трансгенов этих векторов — GFP или FerrH относительно DCX-позитивной площади в нейрогенной зоне вблизи боковых желудочков. Предварительные результаты показали незначительные различия в эффективности трансфекции между опытным (35%) и контрольным полушарием (28%) у животных, инъектированных обоими типами векторов на основе AAV. В то же время у животных с инъекцией векторов на основе LV трансфекция молодых нейронов вдвое выше в опытном полушарии (86%) по сравнению с контрольным (41%). Вероятно менее интенсивное распространение вектора на основе LV связано с иммунным ответом, давления которого не испытывают векторы AAV. Протестированные векторные конструкции могут быть использованы в дальнейшем для исследования нейрогенеза *in vivo* у животных.

Работа выполнена при поддержке РФФ грант № 18-15-00229.

ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ, ПРОДУКЦИИ АФК И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ММСК ПРИ СТАРЕНИИ

Егор Юрьевич Плотников^{1,2}, **Денис Николаевич Силачев**^{1,3}, **Кирилл Владимирович Горюнов**², **Татьяна Игоревна Данилина**¹, **Любава Дмитриевна Зорова**¹, **Ирина Борисовна Певзнер**¹, **Геннадий Тихонович Сухих**², **Дмитрий Борисович Зоров**^{1,2}

¹ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

plotnikov@belozersky.msu.ru

Возрастная структура заболеваемости для многих социально-значимых патологий предполагает лечение прежде всего пожилых пациентов. Используемые в этом случае терапевтические подходы должны учитывать особенности физиологии возрастных пациентов. Это напрямую касается и клеточных технологий, в частности наиболее часто используемых для терапии аутологичных мезенхимальные мультипотентных стромальных клеток (ММСК).

Целью работы было изучение функциональных особенностей старых ММСК, в первую очередь относящихся к энергетическому метаболизму, функционированию митохондрий и развитию окислительного стресса.

Эксперименты проводили на клетках, полученных из костного мозга эмбрионов крыс и взрослых животных (16–18 мес.). Полученные на животных закономерности затем проверялись на ММСК человека, полученных из перинатальных тканей и у взрослых людей. В клетках анализировали продукцию активных форм кислорода (АФК), количество митохондрий и величину митохондриального трансмембранного потенциала, скорость пролиферации и проявления признаков клеточного сенесценса. Одним из ключевых проанализированных параметров была терапевтическая эффективность ММСК из доноров разного возраста, которую изучали при введении животным после моделирования у них черепно-мозговой травмы.

Мы показали, что ММСК от взрослых животных имеют более низкую скорость пролиферации, чем фекальные ММСК, а также повышенную продукцию АФК. Причем повышенная продукция АФК происходит в основном в митохондриях, что доказано применением специфического зонда MitoSOX. Это указывает на возможность повреждения митохондрий стволовых клеток по мере их старения.

Обнаружена аккумуляция в ММСК маркера клеточного старения липофусцина и ассоциированной со старением β-галактозидазы. Важно, что еще более выраженным накоплением этих маркеров было при длительном (более 8 пассажей) культивировании ММСК.

Выявлено, что клетки от взрослых животных обладали значительно меньшей нейропротекторной эффективностью по сравнению с молодыми ММСК в модели черепно-мозговой травмы.

Таким образом, мы показали, что у ММСК из взрослых доноров наблюдается ряд негативных физиологических изменений, которые могут серьезно ограничивать применение аутологичных ММСК для клеточных технологий у возрастных пациентов.

Работа поддержана грантом Президента РФ МД-2065.2018.4.

ЭФФЕКТ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ИБС, КОТОРЫМ ПРОВОДИЛАСЬ ТРАНСМИОКАРДИАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ В СОЧЕТАНИИ С ИМПЛАНТАЦИЕЙ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАННЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОМ КЛЕТОК АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, **Мария Александровна Суровцева**^{1,2}, **Александр Петрович Лыков**^{1,2}, **Ирина Иннокентьевна Ким**^{1,2}, **Наталья Анатольевна Бондаренко**^{1,2}, **Евгения Викторовна Янкайте**¹, **Александр Михайлович Чернявский**², **Алексей Вячеславович Фомичев**²

¹ НИИКЭЛ филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

poveschenkoov@yandex.ru

Функциональная активность трансплантированных клеток зависит от влияния на них биологически активных веществ, как продуцируемых резидентными клетками в области образования новых сосудов, так и клетками, участвующими в неоваскулогенезе. Известно, что эритропоэтин способен влиять на различные типы клеток.

Цель работы: исследование паракринного взаимодействия биологически активных веществ, секретируемых в культуральную среду эндотелиальных клеток и мононуклеарных клеток костного мозга (МНК-КМ) пациентов с ИБС. Оценивали пролиферацию и миграцию клеток в режиме реального времени на приборе xCELLigence System. Для сравнительного исследования при культивировании использовали VEGF и Epo. Показано, что паракринные стимулы кондиционной среды от клеток EA.hy 926 (клетки эндотелиоцитов артерий) не оказывают влияния на пролиферативный потенциал МНК-КМ. В тоже время, кондиционная среда от клеток EA.hy 926 усиливает пролиферацию МНК-КМ, подвергшихся преинкубации с эритропоэтином. Кроме этого, кондиционные среды от МНК-КМ после преколонизации с эритропоэтином приводят к значимому усилению миграции клеток EA.hy926 в направлении к градиенту плотности ростовых факторов. Преколонизация с эритропоэтином способствует значимому усилению продукции МНК-КМ эритропоэтина и снижению уровней продукции PDGF, и не оказывает существенного влияния на продукцию IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IGF, TGF-β, NO. Таким образом, МНК-КМ и эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние, а обработка клеток эритропоэтином способствует повышению функционального состояния суммарного секреторного продукта МНК-КМ пациентов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ММСК IN VITRO ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Анна Григорьевна Полешко,
Игорь Дмитриевич Волотовский

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

renovacio888@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) — один из наиболее востребованных

и давно применяемых в регенеративной медицине инструментов клеточной терапии. Тем не менее, их биология до сих пор активно изучается. Ранее нами было показано, что снижение содержания O_2 в среде роста клеток *in vitro* до физиологических 5% с одновременным внесением фактора роста bFGF приводит к повышению пролиферативной активности и жизнеспособности ММСК с сохранением их мультипотентности. Кроме того, было обнаружено, что добавленный в ростовую среду bFGF активирует на фоне физиологической гипоксии различные синтетические процессы, стабилизируя метаболизм ММСК и способствуя адаптации клеток к низким концентрациям кислорода. Установлено, что адаптационные реакции ММСК на низкие концентрации O_2 связаны с гипоксией-индуцируемым фактором HIF1 и белком транспортом порфириновых пигментов ABCG2.

Целью работы явилось изучение влияния 5% O_2 и фактора bFGF на уровень метилирования ДНК промоторов генов *Hif1-α* и *Abcg2* в ММСК. Клетки получали из жировой ткани человека (с информированного согласия пациентов) и культивировали до 2 пассажа в стандартных условиях (5% CO_2 , 21% O_2 , 37°C) в питательной среде α -MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки, на 3 пассаже ММСК помещали в гипоксические условия (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 , 37°C) и культивировали в питательной среде того же состава в течение 3 сут. Для исследования экспрессии генов белков HIF1- α и ABCG2 использовали ПЦР в реальном времени, для определения уровня метилирования ДНК — метод бисульфитного секвенирования.

Выявлено, что при 5% O_2 экспрессия генов кислород-зависимой α -субъединицы белка HIF1 и белка ABCG2 повышается, в т. ч. за счет снижения уровня метилирования ДНК их промоторных участков. При этом уровень метилирования регулируется и внесением в ростовую среду bFGF. Независимо от содержания O_2 в среде bFGF снижает уровень метилирования ДНК промоторов генов *Hif1-α*, *Abcg2*, что приводит к повышению их экспрессии.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли метилирования ДНК в определении функциональной активности ММСК в условиях культуры при физиологической гипоксии и в присутствии фактора bFGF.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ЗОЛЕТИЛА И ДОМИТОРА НА ТКАНЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VIVO*

Максим Олегович Политко¹, Анна Ивановна Прокаева^{1,2}, Александра Юрьевна Цидулко¹, Эльвира Витальевна Григорьева^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Politko.nsu@gmail.com

Существующая схема лечения глиобластомы включает в себя курс адьювантной радиохимиотерапии, при этом средняя продолжительность жизни составляет 15 месяцев. Для повышения эффективности лечения необходимы новые методы радиотерапии, которые на начальных этапах изучаются в экспериментальных моделях *in vivo*. Облучение экспериментальных животных невозможно провести без применения анестетиков. Один из важных моментов, возникающих при этом, какое

влияние оказывает усыпление на исследуемые в эксперименте параметры. В данной работе мы изучали влияние комбинации препаратов домитор и золетил на такие ключевые компоненты внеклеточного матрикса ткани головного мозга как протеогликаны (ПГ).

Исследование проводили на модели экспериментальных животных *in vivo* (2-месячные самцы мышей C57BL/6). Животных усыпляли с использованием комбинации препаратов Золетил и Домитор три раза с интервалом 24 часа. Уровень экспрессии ПГ (синдекан-1, глипикан-1, перлекан, версикан, бревикан, CSPG4/NG2, CD44, декорин, бигликан и нейрокан) в коре и подкорке головного мозга определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени через 24, 48 и 72 часа после усыпления.

Было показано, что использование анестетиков приводило к изменению уровня экспрессии большинства протеогликанов внеклеточного матрикса ткани головного мозга. В коре происходило увеличение уровня экспрессии синдекана-1 (в 1,5–2,5 раза) и бигликана (в 1,5–2 раза) и снижение уровней экспрессии перлекана (в 1,5–2,5 раза), версикана (в 1,5–5 раз), CSPG4/NG2 (в 1,5–10 раз), CD44 (в 10–30 раз), декорина (в 1,5–3 раза) и нейрокана (в 1,5–4 раза), при этом транскрипционная активность глипикана-1 и бревикана не изменялась. В тканях внекорковых структур головного мозга применение анестезии вызывало снижение экспрессии синдекана-1 (в 3–10 раз), перлекана (в 1,5–2 раза), бревикана (в 1,5–3 раза), CSPG4/NG2 (в 1,5–5 раз), бигликана (в 1,5 раза) и нейрокана (в 2,5–4 раза), а транскрипционная активность глипикана-1, версикана, CD44 и декорина не изменялась. При этом тенденции к восстановлению уровней экспрессии ПГ за наблюдаемый промежуток времени не наблюдалось — вызванные эффекты были видны уже через 24 часа и через трое суток эффект только усугублялся.

Таким образом, при проведении исследований в экспериментальных моделях *in vivo* необходимо учитывать, что усыпление животных может оказывать эффект на исследуемые параметры.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 18-29-01036/18), Цидулко А.Ю. поддержана стипендией Президента РФ (СП-5435.2018.4).

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ И КСЕНОГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И НЕЙРАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА У КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Римма Алексеевна Полтавцева¹,
Денис Николаевич Силачев^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

rimpol@mail.ru

Ишемия головного мозга — патологическое состояние, развивающееся на фоне нарушения мозгового кровообращения, является одной из основных причин

инвалидизации населения во всем мире. Данная патология до настоящего времени не имеет эффективных методов лечения, поэтому поиск эффективных методов лечения ишемии головного мозга чрезвычайно актуален. Целью настоящей работы было изучение влияния трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), полученных из костного мозга плода человека (ММСКч) и ММСК крысы (ММСКкр), а также нейтральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) плода человека (НСПКч) и НСПК крысы (НСПКкр) на выживание, а также устранение неврологических нарушений и выраженности патологических изменений в головном мозге. Исследования были выполнены на крысах с односторонним повреждением сенсомоторной коры методом фотоиндуцированного тромбоза сосудов головного мозга, которое приводило к образованию фокального очага ишемического повреждения коры головного мозга. Трансплантацию клеток проводили через сутки после моделирования ишемии. Неврологический статус животных оценивали до индукции ишемии головного мозга, а так же на 7, 14 и 21 день после ишемии. Нейровизуализацию проводили при помощи магнитно-резонансной томографии. Показали, что трансплантация всех типов клеток, как аллогенных, так и ксеногенных способствовала снижению смертности, уменьшению объема повреждения и снижению неврологического дефицита. Выраженность эффекта напрямую зависела от типа трансплантированных клеток, максимальное снижение смертности было отмечено у крыс после трансплантации НСПКкр, введение ММСКч и НСПКч в большей степени способствовало снижению объема повреждений, неврологический дефицит был менее выражен у крыс после трансплантации НСПКч и ММСКкр.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КАРКАСА ИЗ ФРАГМЕНТА ДОНОРСКОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Анна Сергеевна Пономарева, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Юлия Борисовна Басок, Игорь Александрович Милосердов, Виктор Иванович Севастьянов

ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

a.s.ponomareva@gmail.com

Одной из актуальных задач создания функционально активной ткани поджелудочной железы является разработка тканеспецифического каркаса, способного имитировать для островков Лангерганса необходимое микроокружение биологической среды.

Цель работы: получение тканеспецифического каркаса из децеллюляризованных фрагментов поджелудочной железы человека (ПЖ).

Материалы и методы. Протокол децеллюляризации включал в себя 3 цикла замораживания и оттаивания фрагментов ПЖ с последующим механическим измельчением ткани и отмывкой в трех сменах буферного раствора (рН = 7,4), содержащего растворы 0,1% додецилсульфата натрия и повышающую концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3%, соответственно). На каждом этапе децеллюляризации проводили рутинное окрашивание образцов гематоксилином и эозином, DAPI,

на общий коллаген (метод Массона) и на эластические волокна (метод Унны-Тенцера). Дополнительно, проводили иммуногистохимический анализ срезов децеллюляризованных фрагментов ПЖ на коллаген 1 типа. Определяли количество ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ и исследовали цитотоксичность полученных образцов.

Результаты. Гистологическое исследование показало, что в процессе проведения децеллюляризации в образцах фрагментов ткани ПЖ не было обнаружено сохранившихся клеток, клеточных ядер и продуктов карioreксиса, зерен детрита.

Соединительнотканый каркас представлен тонковолокнистой сетевидной структурой, позитивно окрашенной по методу Массона, по методу Унны-Тенцера и на коллаген 1 типа. Было установлено, что при децеллюляризации ПЖ в ткани сохранилось лишь около 0,1% ДНК. Полученные результаты показали отсутствие цитотоксичности децеллюляризованной панкреатической ткани.

Выводы. Предложенный протокол децеллюляризации фрагментов донорской ПЖ является эффективным и позволяет получить свободный от клеток и клеточных фрагментов тканеспецифический матрикс с низкой иммуногенностью, в составе которого идентифицируется коллаген 1 типа и эластин. Полученный матрикс не проявляет признаков цитотоксичности и может в дальнейшем использоваться для рецеллюляризации островками Лангерганса.

ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ КСЕНОГЕННОГО ВЫСОКООЧИЩЕННОГО АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

Юлия Вячеславовна Пономарева, Наталья Николаевна Сарбаева, Марина Николаевна Милакова

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, Самара, Россия

jrponomareva@mail.ru

Ацеллюлярные матриксы из тканей и органов животных являются перспективными для применения в хирургии. Однако механические свойства таких материалов, способность к биодеградации, биологическая и иммунологическая безопасность и достигаемый лечебный эффект при имплантации, зависят от особенностей технологии их изготовления.

Ацеллюлярный дермальный матрикс (АДМ) получали из шкур свиней путем последовательной обработки соевым гипертоническим раствором, 2% раствором дезоксихолата натрия (ДХ), 0,7% раствором липазы на 2%-ном ДХ, а затем ДНК-азой в концентрации 40 ед./мл. После финальной промывки, лабораторные образцы подвергали стерилизации в 70% спирте.

Структуру полученного АДМ оценивали в поляризованном свете. Стандартными методами определяли остаточное содержание нейтральных липидов и ДНК. Протеом АДМ исследовали методом электрофоретического разделения белков. Биосовместимость оценена на сроках от 28 до 180 суток путем подкожной имплантации образцов АДМ крысам по задней поверхности шеи.

При исследовании в поляризованном свете АДМ представлен многочисленными фибриллами различной

толщины, формирующих трехмерную сетчатую структуру с сохранением эффекта двойного лучепреломления, что характерно для нативного коллагена. По данным электрофореграмм — основным компонентом АДМ был коллаген. Нейтральные липиды отсутствовали, а содержание ДНК снижено до 13% от исходных показателей. К 28 суткам АДМ был диффузно инфильтрировали многочисленными фибробластами, тучными клетками, пронизан новообразованными сосудами. У части образцов до 45 суток в окружающей АДМ соединительной ткани выявлены единичные скопления лимфоцитов и нагруженные гемосидерином макрофаги. К 180 суткам АДМ полностью интегрировался в хорошо васкуляризованную рыхлую соединительную и жировую ткани, при этом сохранялась трехмерная структура собственных волокон АДМ.

Таким образом, ксеногенные АДМ высокой степени очистки не инициируют воспалительной реакции, не подвергаются биодеградации, способны быстро и равномерно интегрироваться в окружающие ткани без инкапсуляции, что позволяет рассматривать их как перспективный материал для безопасной и долгосрочной имплантации.

СИНАПТАМИД УЛУЧШАЕТ ПОКАЗАТЕЛИ КОГНИТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ У КРЫС С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

**Арина Игоревна Пономаренко,
Игорь Викторович Манжуло**

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

combobraker@list.ru

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) определяется как повреждение головного мозга в результате воздействия внешней механической силы и может привести к временному или постоянному нарушению когнитивных, физических и психосоциальных функций. Повреждение мозга при ЧМТ включает повреждение нейронов и глиальных клеток, синаптические разрывы, нарушение целостности или тромбоз церебральных сосудов.

N-Докозагексаэноилэтаноламид (синаптамид) представляет собой эндоканнабиноидоподобный метаболит, эндогенно синтезируемый из докозагексаеновой кислоты (DHA, 22: 6n-3), основной омега-3 полиненасыщенной жирной кислоты входящей в состав клеточных мембран нервной ткани. Синаптамид в наномолярных концентрациях способствует нейрогенезу, удлинению нейритов и синаптогенезу в развивающихся нейронах.

В настоящей работе исследовались когнитивные функции животных после ЧМТ на фоне введения препарата. Синаптамид (10 мг/кг) вводили ежедневно подкожно в течение 8 дней после операции. В ходе эксперимента животных тестировали на некоторые аспекты когнитивной деятельности, такие как долгосрочная память (условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)) и тревожность (приподнятый крестообразный лабиринт).

При анализе мы отметили увеличение общего уровня тревожности у крыс в группе «ЧМТ». Животные больше времени проводили в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, чем в открытых и в центре, в отличие от животных, получающих синаптамид. Процент времени в закрытых рукавах составлял 85,7±4,1% в группе «ЧМТ» и 64,6±5% в группе «ЧМТ+синаптамид», в норме он составил 43,5±6,7%.

В тоже время, тест УРПИ показал значительное ухудшение долговременной памяти у крыс с ЧМТ, при этом данный показатель в группе «ЧМТ+синаптамид» был несколько выше контрольного уровня. Для исследования УРПИ крыс помещали в камеру, состоящую из светлого и темного отсеков. Следуя норковому инстинкту крыса перемещалась в темную комнату, где получала удар током (0,35 мА, 2 сек.). При повторном тестировании через 24 часа оценивалось время повторного входа в темную комнату. В группе «ЧМТ» это время составляло 35,5±10 сек., и 91±12 сек. в группе «ЧМТ+Синаптомид», а в группе ложнооперированных животных данный показатель составлял 71,8±11,8 сек.

Таким образом, механизмы активности синаптамида в качестве нейропротектора, а также ингибитора нейровоспаления нуждаются в дальнейшем исследовании. Однако уже на сегодняшний день понятно, что данный препарат является перспективным для терапии различных нейропатологических состояний.

РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МАТРИЦЫ ИЗ ПОЛИ(L-ЛАКТИДА)

Гурий Иванович Попов¹, Павел Васильевич Попрядухин², Галина Юрьевна Юкина¹, Валерий Николаевич Вавилова¹, Владимир Евгеньевич Юдин², Елена Михайловна Ивановская², Ирина Петровна Добровольская², Наталия Владимировна Смирнова²

¹ СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

trek-4300@yandex.ru

Введение: проблема дефицита пластического материала в современной сосудистой хирургии может быть решена путем создания тканеинженерного сосудистого имплантата.

Цель работы: оценка роли предварительно культивированных МСК ЖТ в формировании тканеинженерного имплантата кровеносных сосудов малого диаметра на основе биодеградируемой матрицы из поли(L-лактида).

Материалы и методы: биорезорбируемые высокопористые 3D-матрицы трубчатой формы были получены методом электроформования из поли(L-лактида). Посев мезенхимных стволовых клеток жировой ткани выполнялся разработанным фильтрационным методом. Последующее культивирование осуществлялось в сконструированном проточном биореакторе в течение 14 сут. Полученные тканеинженерные препараты имплантировали в брюшную аорту крысы на срок до 24 недель.

Результаты: проходимость графтов составила 96% (23/24). Тканеинженерный имплантат состоял из неоинтимы, представленной эндотелием и субэндотелиальным слоем, неоимедии из соединительной ткани и гладкомышечных клеток, неоадвентиции.

Выводы: предварительное заселение мезенхимными стволовыми клетками жировой ткани ПЛА матрицы привело к формированию имплантата по морфологическим признакам приближенного к строению естественного сосуда.

Авторы благодарят Российский научный фонд за финансовую поддержку (грант № 19-73-30003).

ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ОСТЕОАРТРОЗА КРУПНЫХ СУСТАВОВ ПУТЕМ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВЕДЕНИЯ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ АУТОЛОГИЧНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Игорь Юрьевич Попов, Игорь Александрович Аتمانский, Иван Анатольевич Громов, Ильдар Наркисович Шарипов, Анна Александровна Быкова

Южно-уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

igorpopov920217@gmail.com

Введение. Подкожная жировая клетчатка является богатым депо стволовых и прогениторных клеток, которые активно используются для лечения ОА. Основным преимуществом жировой ткани является малоинвазивность процедуры забора, которую проводят под местной анестезией с минимальным болевым синдромом, дискомфортом и риском для пациента.

Цель работы: оценить действие эмульгированной жировой ткани (Nanofat) на болевой синдром и объем движения в суставах на разных стадиях остеоартроза (ОА).

Материалы и методы. В исследование включено 70 пациентов с ОА коленного сустава (16 с 1 стадией, 40 с 2 стадией, 14 с 3 стадией), 22 мужчин, 48 женщин. Средний возраст пациентов 46, средний ИМТ 29 Работа проводится в формате инициативного открытого сравнительного исследования, соответствующее этическим стандартам комитетов по биомедицинской этике. Наблюдение за пациентами осуществляется в течение 6 месяцев после введения препарата. 1 этап: гониометрия, заполнение опросников и оценка по ВАШ. 2 этап: проводилась липоаспирация под местной анестезией, затем осуществлялась механическая обработка полученной жировой ткани. Полученная эмульсия в количестве 4–8 мл вводилась через иглу в сустав под УЗИ контролем. 3 этап: повторная гониометрия, заполнение опросников и оценка по ВАШ.

Результаты. после введения препарата у пациента отмечалось увеличение объема движений в суставе до 20 градусов, снижался болевой синдром. Оценка по опросникам: индекс Лекена, WOMAC, SF-36, HADS. У 16 пациентов через день после введения препарата отмечалось наличие свободной жидкости в суставе, без усиления болевого синдрома, который самостоятельно купировался в течение 4–5 дней. В последующем наступал указанный ранее положительный эффект. Достаточный объем движений и купированный болевой синдром наблюдался у 16 пациентов с 1 стадией, на весь период наблюдения. У пациентов со 2 стадией 14 человек сохранение эффекта на 6 месяцев, 8 человек - 5 месяцев, 6 человек — 4 месяца, 12 человек менее 3 месяцев. Пациенты с 3 стадией 6 пациентов наблюдение положительного эффекта на 4 месяца, 2 пациентов менее 3 месяцев. У 6 пациентов с 3 стадией артроза и варусной деформацией нижней конечности сохранялся болевой синдром.

Выводы: результаты клинического исследования свидетельствуют об эффективности введения Nanofat для купирования болевого синдрома и увеличения объема движения в коленном суставе при ОА 1 и 2 стадии.

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА АДГЕЗИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЕРАТИНОЦИТОВ В ЭПИДЕРМАЛЬНОМ ЭКВИВАLENTE КОЖИ

Анна Николаевна Попова¹⁻³, Ольга Сергеевна Роговая^{1,2}, Ксения Михайловна Дрыгина³, Екатерина Андреевна Воротеяк¹⁻³

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва, Россия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

popova.anna.n@gmail.com

Эпидермальные эквиваленты кожи (ЭЭК) используют в регенеративной медицине для лечения ожоговых больных. Криохранение культур кератиноцитов позволяет планировать хирургические вмешательства и накапливать материал для последующих операций. Однако при этом возникает проблема сохранения жизнеспособности и пролиферативной активности в культуре кератиноцитов человека, прошедшей стадию криохранения.

Цель работы: разработка способа хранения компонентов ЭЭК (первичной культуры кератиноцитов человека) с длительным сохранением жизнеспособности, пролиферативной и метаболической активности.

Задачи исследования: разработка протокола хранения компонентов ЭЭК при отрицательных температурах и исследование влияния криоконсервации на культуры кератиноцитов, в том числе на селекцию низкодифференцированных клеток.

Криоконсервацию кератиноцитов проводили на программном замораживателе Planer 550/16. Эффективность протокола замораживания оценивали по жизнеспособности клеток, способности к адгезии и метаболической активности культуры кератиноцитов. Анализ экспрессии генов адгезии и дифференцировки в кератиноцитах до и после криоконсервации проводили методом RT-PCR (ламинин V, коллаген IV, лорикрин, инволюкрин, интегрин $\alpha\beta 4$). Наличие маркеров дифференцированных кератиноцитов до и после заморозки оценивали при помощи проточной цитометрии (СК14 и инволюкрин).

Разработан состав криосреды на основе культуральных сред Cnt07, DKSFM и DMEM/F12. Был выбран оптимальный протокол замораживания кератиноцитов: скорость замораживания составляла 1°C в мин. у в интервале температур от +4°C до -30°C. Показано, что после замораживания снижается количество клеток, экспрессирующих СК14 и инволюкрин. При этом процент кератиноцитов, интенсивно экспрессирующих интегрин $\alpha\beta$, увеличивается в 3 раза, а экспрессия генов внеклеточного матрикса (коллаген IV, ламинин V) уменьшается, таким образом можно говорить о селекции низкодифференцированных клеток. Культуры клеток, прошедшие стадию криохранения, показали повышенную в сравнении с первичными культурами адгезию к биосинтетической матрице, высокую пролиферативную активность и рост в составе ЭЭК в течение 10 суток.

Работа выполнена в рамках ПНИЭР по теме «Разработка технологии производства, хранения и применения биомедицинских клеточных продуктов для лечения ран» в соответствии с Соглашением о предоставлении субсидии с Минобрнауки России № 14.610.21.0012, Уникальный идентификатор работ RFMEFI61017X0012.

ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9

Ольга Владимировна Попова

Институт философии РАН, Москва, Россия

J-9101980@yandex.ru

Современный биоэтический дискурс артикулирует разнородные этические подходы к анализу антропологически рисков применения технологии CRISPR/Cas9. Преимущественно в современной биоэтике представлены две линии анализа этических проблем развития технологий редактирования человека. Первая линия связана с оценкой общего контекста безопасности применения технологий редактирования генома человека в терапевтических целях. Вторая линия артикулирует также отдельные этико-философские проблемы, возникающие в связи с проведением фундаментальных исследований в области редактирования зародышевой линии человека и последующим применением технологий редактирования генома, подобных CRISPR/Cas9. В этих дискурсах отмечается слабость медицинской аргументации, оправдывающей применение CRISPR/Cas9 у эмбрионов, рассматриваются риски редактирования генов зародышевой линии с целью улучшения человеческих качеств, улучшения когнитивных и физических способностей. Именно нетерапевтический контекст применения технологий редактирования генома поднимает целый спектр нерешенных этических проблем, связанных с тем как данная технология способна повлиять на отдельные человеческие популяции и, в целом, на генофонд человечества, насколько возможно и допустимо распространение социального неравенства в контексте ограниченного доступа к генетическим технологиям и др. Специфика современных исследований в сфере биологии и биотехнологий заключена в том, что философская (в широком смысле) и (био)этическая (как более конкретный аспект) рефлексия оказывается включенной внутрь самих биотехнологических проектов как их составная часть. Эксперт в области биоэтики выступает уже не только как отстраненный теоретический «наблюдатель», но и как соучастник, представляющий междисциплинарную команду гуманитариев, исследующих социальные, правовые и этические аспекты реализации этих проектов. В этой связи постоянный этический мониторинг инновационных технологий, подобных CRISPR/Cas9, в контексте развития новых перспектив модификации природы человека становится все более актуальной задачей.

Публикация подготовлена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-18-00422.

РЕГУЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И МОРФОЛОГИИ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МИКРОЧАСТИЦ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Татьяна Николаевна Попырина^{1,2},
Любовь Андреевна Киляшова¹, Татьяна Владимировна Черненко¹, Christian Grandfils³, Татьяна Сергеевна Демина^{1,2,4}

¹ Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия;

² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия;

³ Interfaculty Research Centre on Biomaterials (CEIB), University of Liège, Liège, Belgium;

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

tanjapopyrina@yandex.ru

Биодеградируемые полимерные микрочастицы широко применяются в медицине в качестве систем пролонгированного выделения и/или направленной доставки биоактивных компонентов, а также имеют значительный потенциал для использования в качестве клеточных микроносителей и исходных материалов для создания трехмерных структур для тканевой инженерии методами аддитивных технологий, в т.ч. селективным лазерным спеканием. В процессе формирования таких микрочастиц важно контролировать их химическую структуру и морфологию.

Цель работы заключалась в оценке возможности управления структурой и морфологией объема и поверхности микрочастиц в процессе их изготовления методом испарения растворителя из эмульсии путем модифицирования химической структуры и состава дисперсионной фазы и дисперсионной среды.

Модифицирование дисперсионной среды позволяет в основном регулировать состав и морфологию поверхностного слоя микрочастиц. Использование производных хитозана и его амфифильных привитых сополимеров позволяет получать микрочастицы с высоким выходом и поверхностью, обогащенной гидрофильными фрагментами. Увеличение степени замещения аминогрупп хитозана и полимеризации привитых на него цепей приводит к повышению его эффективности в качестве эмульгатора в дисперсионной среде [T.S. Demina, et al. // Mater. Sci. Eng. C. 2016. V. 59. P. 333–338]. Для получения микрочастиц со структурой ядро/оболочка можно использовать в качестве эмульгатора наночастицы различной природы. Стабилизацию границы раздела фаз в таких т.н. эмульсиях Пикеринга можно осуществлять с использованием наночастиц, полученных как по методам «сверху-вниз», так и «снизу-вверх». В первом случае в качестве дисперсионной среды можно использовать нанокристаллические полисахариды (Yu.S. Sotnikova, et al. 2018; T.S. Demina, et al. 2018). Также для стабилизации эмульсий можно применять керамические наночастицы или макромолекулярные агрегаты из хитозана и его производных. Модифицирование химической структуры полимера в дисперсионной фазе позволяют формировать «самостабилизирующиеся» микрочастицы сложной морфологии, а также композиционные гибридные микрочастицы [T.S. Demina et al. 2019].

Финансирование исследования: грант Президента Российской Федерации (МК-1974.2019.3) и Wallonie-Bruxelles International (WBI).

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И (ИЛИ) ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК МЫШИ К ГАММА-И НЕЙТРОННОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ

Галина Ароновна Посыпанова, Мария Григорьевна Ратушняк, Юлия Павловна Семочкина, Елизавета Юрьевна Москалева

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

galinapo@gmail.com

Угнетение нейрогенеза, индуцируемое ионизирующим излучением, определяется потерей радиочувствительной популяции нейральных стволовых (НСК) и прогениторных клеток (НПК) в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, что приводит к снижению образования новых нейронов в мозге и, в результате, к снижению когнитивных функций.

В работе использовали НСК/НПК, выделенные из головного мозга неонатальных мышей. Выделенные НСК/НПК были охарактеризованы по маркерам НСК/НПК на разных пассажах культивирования. Доля нестин-положительных клеток составляла 95–99,7%. Доля клеток, экспрессирующих одновременно CD133 и GFAP (НСК), составила 25–38%, что коррелировало с долей клеток из общей популяции, способных к дифференцировке в нейроны и глию при удалении из ростовой среды факторов роста EGF и FGF.

Клетки облучали на установке «ГУТ-200М» (γ -излучение, ^{60}Co) и в коллимированном пучке нейтронов и γ -квантов ядерного реактора ИР-8 (смешанное γ -нейтронное (γ, n) излучение). Обнаружено, что после воздействия γ -излучения через 72 ч инкубации возрастало содержание CD133⁺/GFAP⁺ клеток, которое сохранялось повышенным до 7 сут. инкубации после облучения. Обнаружено, что НСК/НПК более чувствительны к γ, n -излучению, чем к γ -излучению. Чувствительность клеток оценивали по их выживаемости, клоногенной активности и эффективности репарации двуниевых разрывов ДНК (ДР).

Динамика репарации ДР различалась в клетках, облученных γ -квантами и после γ -нейтронного облучения. Так после γ -облучения НСК/НПК в дозе 1 Гр максимум репарации ДР, оцениваемой по количеству фокусов флуоресценции фосфорилированного гистона H2AX (γ -H2AX), был зарегистрирован через 1 ч после облучения. С увеличением времени инкубации количество фокусов γ -H2AX снижалось и достигало контрольного уровня через 48 ч. После γ, n -облучения максимальный уровень репарации также наблюдался через 1 ч, однако репарация ДР происходила значительно медленнее. Снижение числа фокусов γ -H2AX было зарегистрировано только через 6 ч после облучения и достигало контрольного уровня через 24 ч. По-видимому, это связано с тем, что нейтроны (как и заряженные частицы) индуцируют возникновение сложных повреждений ДНК кластерного типа, репарация которых затруднена. Кластерные повреждения либо остаются невосстановленными, либо репарация происходит с ошибками, что и в том, и в другом случае может приводить к гибели клеток по пути апоптоза или аутофагии.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1363 от 25.06.2019).

РАЗВИТИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ЛЕЧЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Михаил Петрович Потапнёв

РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Минздрава Республики Беларусь, Минск, Беларусь

mpotapnev@yandex.by

В XXI веке, по данным Всемирной организации здравоохранения, основными проблемами здравоохранения становятся хронические заболевания человека (заболевания сердца и сосудов, рак, диабет, заболевания легких), которые будут причиной 70% случаев смерти человека. Это является основой для развития регенеративной медицины, занимающейся восстановлением поврежденных структуры и функции органов и тканей.

В Республике Беларусь противоопухолевая иммунотерапия, основанная на использовании естественных киллерных (ЕК) клеток и их производных (ЛАК-клеток) практиковалась с 1990-х годов. С 2006 года началась работа по разработке клеточных технологий лечения под руководством Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Она завершилась к 2013–2014 годам, когда получили государственную аккредитацию 3 лаборатории клеточных технологий на производство биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и были внесены в закон о здравоохранении статьи, регламентирующие их клиническое применение. В течение 2011–2018 годов исследования в области клеточных технологий лечения озаменовались разработкой 25 методов медицинского применения различного типа БМКП. Перечень применяемых БМКП включает мезенхимальные стволовые клетки, дендритные клетки, кожные фибробласты, паратиоциты, цитокин-индуцированные лимфоидные клетки. Лечение получило около 750 пациентов 11 республиканских научно-практических центров и организаций здравоохранения. Основными показаниями были реакция трансплантат против хозяина после пересадки гемопоэтических стволовых клеток, реакцией отторжения почки, острая почечная недостаточность, трофические язвы кожи, дефекты стенки брюшной полости, дефекты суставного хряща, ишемическая кардиопатия, туберкулез, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, симптоматическая эпилепсия, рак молочной железы, острый миелолейкоз, стеноз трахеи. Использование БМКП (в основном — аутологичного происхождения) не приводило к смертельным и тяжелым осложнениям. Выраженный благоприятный клинический эффект от применения БМКП наблюдался более чем в 50% случаев и в сроки от 3 месяцев до 3 лет даже после многократного их применения.

В результате проведенных работ клеточные технологии все более интегрируются в медицинскую практику оказания медицинской помощи в Республике Беларусь.

ОСОБЕННОСТИ БИОИНТЕГРАЦИИ ГЕНАКТИВИРОВАННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ОКФ

**Евгений Валерьевич Пресняков¹,
Оксана Владимировна Савва¹, Илья
Ядигерович Бозо², Владимир Сергеевич
Комлев³, Роман Вадимович Деев^{4,5}**

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия;

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, Россия;

³ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия;

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия;

almazov.eugeny@yandex.ru

Существенной проблемой в травматологии и ортопедии является лечение пациентов с критическими дефектами костей скелета. Для решения данной проблемы используются костные аутотрансплантаты, деминерализованный костный матрикс, а также применяется костная пластика по Илизарову. Каждый из этих способов лечения имеет свои недостатки, побуждающие к разработке более эффективных материалов и методов для костной пластики. Одним из таких может стать использование персонализированных генактивированных биорезорбируемых имплантатов из октакальциевого фосфата (ОКФ), точно соответствующих форме и размерам костному дефекту.

Цель исследования. Оценить особенности биоинтеграции имплантатов из октакальциевого фосфата, изготовленных с использованием 3D печати, в эксперименте.

Материал и методы. Работа выполнена на свиньях-самцах средней массой 50 ± 2 кг ($n=4$). Для проведения эксперимента были сформированы дефекты нижней челюсти и большеберцовой кости. Дефект угла нижней челюсти имел размеры $25 \times 15 \times 10$ мм, а по ширине соответствовал кости. Дефект диафиза большеберцовой кости имел Т-образную форму со следующими размерами: центральная часть 10 мм в длину, а по ширине соответствовала диаметру кости, и две периферические части размерами $10 \times 5 \times 5$ мм, формирующие краевые кортикальные дефекты. Общая протяженность — 30 мм. С помощью технологии 3D печати были изготовлены имплантаты из ОКФ, которые, затем, имплантировались в сформированные костные дефекты и фиксировались с помощью реконструктивных пластин. Результаты оценивали через 3 и 6 мес. после операции. По данным КТ рассчитывались размеры имплантированных изделий в зоне их локализации. Гистологические исследования выполнялись по стандартной методике.

Результаты. Ни одно животное не погибло за время эксперимента. Опороспособность конечностей восстановилась через 2 недели после операции. По данным КТ, имплантаты определялись во всех случаях в области костного дефекта, были расположены точно в зоне имплантации и интегрированы с окружающими стенками костного дефекта. По данным гистологического исследования ОКФ-блоки были полностью интегрированы со стенками костного дефекта без формирования соединительнотканной капсулы. Образование костного регенерата наблюдалось со стороны периоста, и, в то же время,

поры центральной части имплантатов также были заполнены костным регенератом.

Выводы. С помощью технологий 3D печати можно изготовить персонализированные блоки из ОКФ, которые могут быть эффективны для реконструкции протяженных костных дефектов.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

**Евгения Алексеевна Примакова, Алла
Александровна Сыманович, Екатерина
Геннадьевна Петровская, Екатерина
Александровна Назарова, Наталья Ивановна
Дедюля, Евгения Сергеевна Бузук, Виктория
Владимировна Смольникова, Виктория
Юрьевна Гриневич, Наталья Феодосьевна
Миланович, Светлана Ивановна Кривенко**

Минский научно-практический центр хирургии,
трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

gane_sel@mail.ru

Благодаря своим иммунорегуляторным свойствам, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) широко применяются в терапии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), однако клеточная терапия не всегда оказывается эффективной.

Цель исследования — анализ изменения субпопуляционного состава лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоГСК) без клинических проявлений и с проявлениями РТПХ на подложке из культур МСК жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ). В исследование было включено 22 культуры лимфоцитов (14 от реципиентов с РТПХ и 8 — без проявлений РТПХ в период отстройки кроветворения) и 33 совместные культуры на подложке из МСК ЖТ и КМ (из них 20 — от реципиентов с РТПХ и 13 — без проявлений РТПХ). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Результаты. Анализ иммунофенотипа лимфоцитов реципиентов с РТПХ показал тенденцию к увеличению процента Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+CD127^-$) как от всей популяции $CD3^+$ (0,78% и 1,1%), так и от $CD4^+CD25^+$ (2% и 3% соответственно) при культивировании на подложке из МСК без статистически значимых различий между группами ($p=0,16$ $n=20$). Также следует отметить наличие общей тенденции (как у реципиентов с РТПХ, так и без) к снижению количества Т-лимфоцитов за счет увеличения процентного соотношения НК-клеток (6% и 13,1% при РТПХ) в культурах на подложке из МСК с наибольшими значениями при РТПХ. Отсутствие статистически значимых различий между лимфоцитами на подложке из МСК и без объясняются как различными иммуномодулирующими свойствами конкретной культуры МСК, так и различной степенью активации микроокружения МСК (наличие РТПХ). Так при культивировании лимфоцитов одного и того же реципиента с признаками РТПХ на подложках из 2-х культур МСК — МСК ЖТ РЗ и МСК КМ РЗ, процентное соотношение $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$, $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ и $CD3^+CD16^+CD56^+$ клеток для этих культур МСК

отличалось почти в 2 раза. Причем на подложке из МСК ЖТ увеличивалось количество активированных цитотоксических лимфоцитов (с 6,7 до 11,4%) и снижалось количество Т-регуляторов (с 1,8 до 0,6%) по сравнению с интактными лимфоцитами. На подложке из МСК КМ, напротив, наблюдалось увеличение количества Т-регуляторов (с 1,8 до 3,1%) при отсутствии изменения количества CD3⁺CD8⁺.

Заключение. Культуры МСК, полученные от разных доноров, обладают различным по степени выраженности иммунорегуляторным потенциалом, поэтому необходим персонализированный подход к подбору трансплантата МСК.

АДДИТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Валерий Иванович Путляев, Павел Владимирович Евдокимов, Алексей Викторович Гаршев, Елена Сергеевна Климашина, Татьяна Викторовна Сафронова, Ярослав Юрьевич Филиппов, Иван Михайлович Щербаков, Вадим Эрикович Дубров
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

valery.putlayev@gmail.com

Одним из важнейших направлений в области современного медицинского материаловедения является разработка персонализированных материалов для остеопластики (костных имплантатов), которые предназначены для восстановления поврежденной костной ткани и ее функционала. В идеале такие имплантаты должны обладать контролируемой скоростью резорбции для возможности применения их в различных клинических случаях, то есть их химический состав должен быть индивидуально подобран для каждого пациента. Используемый имплантат должен не только повторять форму дефекта пациента, но также быть хорошо проницаемым материалом с проектируемой системой порового пространства.

В последнее время всё большее внимание уделяют так называемому регенеративному подходу, в рамках которого имплантату отводят роль не только конструкции с определенными механическими характеристиками, но и источника веществ, необходимых для формирования новой костной ткани. Таким образом, предполагается, что с течением времени произойдет полное замещение имплантируемого материала нативной костью пациента. Регенеративные методы лечения используют конструкции тканевой инженерии для восстановления биологических функций кости. Создание КТИ для лечения костных дефектов особенно важно, если размер дефекта превосходит критический и для восстановления костной ткани собственных возможностей организма.

Для создания персонализированных имплантатов сложной формы с заданной архитектурой пор можно воспользоваться исключительно методами аддитивных технологий, создав по данным компьютерной томографии пациента материал необходимой формы для восстановления поврежденных тканей.

В данном сообщении затрагиваются физико-химические и инженерные основы для создания высокопроницаемых биорезорбируемых материалов с разными уровнями пористости и заданной архитектоникой различными методами аддитивных технологий. В докладе рассмотрены способы получения керамических, гидрогелевых, а также композиционных материалов для регенерации костной ткани методами робокастинга, а также стереолитографической 3D печати.

Доклад подготовлен авторским коллективом в рамках теоретических и экспериментальных работ по проектам РФФИ № 19-03-00940, 18-33-00789, 19-38-60063, 18-53-00034, 18-08-01473, 18-29-11079, 18-33-00974 с использованием оборудования, приобретенного за счет Программы развития Московского университета.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВОЙХ КЛЕТОК ПРИ ХИМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Анна Андреевна Расторгуева, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виталий Андреевич Брунчуков, Дарья Юрьевна Усупжанова, Ирина Владимировна Кобзева, Виктория Андреевна Никитина, Сергей Владимирович Лищук, Елена Александровна Дубова, Инна Михайловна Барабаш, Анастасия Евгеньевна Махова, Валентин Андреевич Брумберг, Татьяна Васильевна Карасёва, Екатерина Игоревна Добровольская, Елена Евгеньевна Ломоносова, Марина Александровна Таратоненкова, Татьяна Федоровна Маливанова, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов

ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им.А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

rastorgueva.ann@gmail.com

Введение. В настоящее время одним из перспективных направлений в лечении ран кожи и ее придатков является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и продуктов их жизнедеятельности.

Цель: оценка влияния воздействия кондиционированной среды МСК слизистой ткани десны человека на регенерацию тканей при химических ожогах у лабораторных животных.

Материалы и методы. Моделирование химического ожога проводили 16 лабораторным животным (крысы Wistar мужского пола весом 163,5±16,6 г и поверхностью тела 329,1±21 см²) по стандартной методике (с 50% трихлоруксусной кислотой), которые были разделены на 2 группы: контрольная (К) — без терапии ожогов; опытная (О) — с однократным интродермальным введением кондиционированной среды МСК в объеме 0,5 мл (количество клеток 2 млн/кг) через 24 часа после травмы. Площадь поражения кожных покровов составила 5,08±0,02 см². Лабораторных животных наблюдали в течение 28 дней: 0, 1, 3, 7, 14, 21 и 28 сутки исследования. Проводили планиметрическое и гистологическое исследование.

Результаты. Во всех группах сразу после получения химического ожога формировался сухой дерматит, на 3 сутки отмечали влажный дерматит, на 7 сутки — формировалась ожоговая рана, покрытая плотным гнойно-геморрагическим струпом. Вокруг раны определялась зона перифокального воспаления, некротический эпидермис ограничивался демаркационной линией. В группе О отмечались признаки умеренного ангиогенеза в области рубца с вновь образованным пролиферирующим эпидермисом толщиной в 2–4 клетки. Самостоятельное сегментарное отторжение струпа было зафиксировано в группе О на 14 сутки, а в группе К на 24±2 сутки, площадь ожоговой поверхности сократилась от исходной

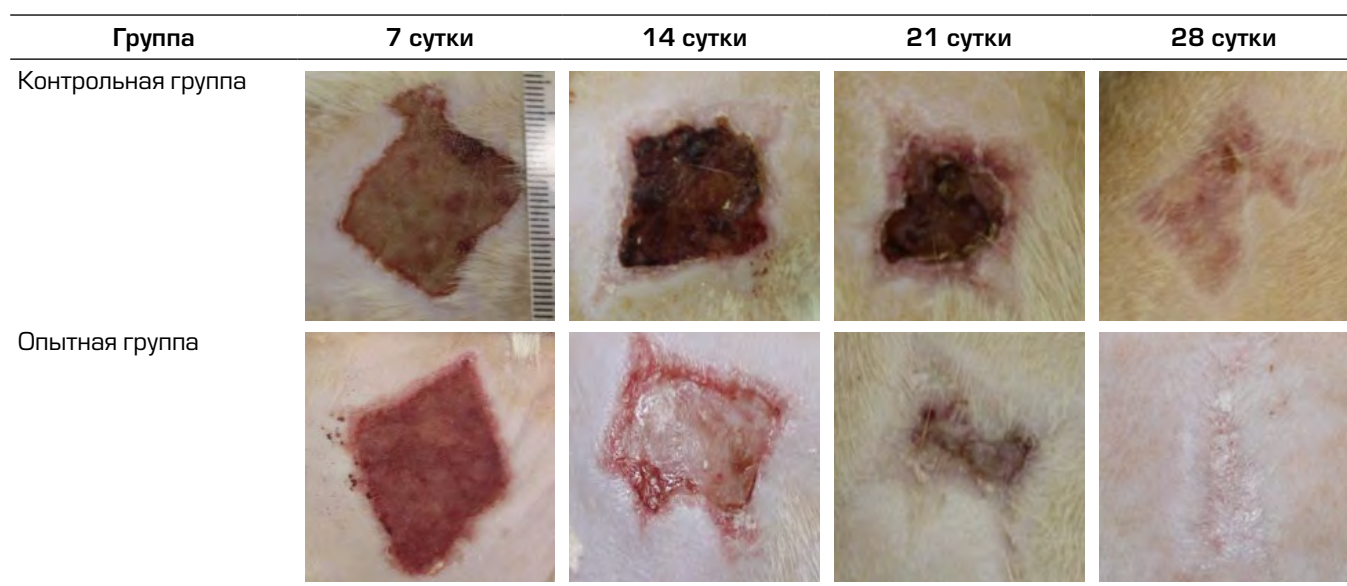


Рис. Ожоговые раны лабораторных животных на разных сроках эксперимента

Таблица 1. Динамика заживления ожоговой раны у лабораторных животных (в см²).

Группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Контрольная группа	5,28±1,42	3,13±1,36*	1,17±0,83*	0,57±0,58*
Опытная группа	4,88±0,75	2,20±0,66*	0,81±0,49*	0,18±0,12*

* $p \leq 0,05$

на 72,3±10,0% и 26,1±7,9% соответственно, $p \leq 0,05$. Полная эпителизация раны была зарегистрирована в группах К и О на 34,0±5,2 и 27,0±2,5 сутки соответственно. На месте ожогового поражения образовался рубец, в группе К в большинстве случаев (95%) отмечались гипертрофические и атрофические рубцовые изменения (площадь рубца составляла 1,22 см²), а в группе О рубец был сглажен, ограничен по площади, узкий и малозаметный (площадь — 0,35 см²), $p \leq 0,05$.

Заключение. Применение кондиционированной среды МСК приводит к сокращению сроков заживления, формированию ограниченных, нормотрофических, значительно меньших по площади рубцов и оказывает положительное влияние (ускоряет образование грануляционной ткани, ее созревание и эпителизацию) на регенерацию тканей при химических ожогах по сравнению с контрольной группой.

ЭКСПРЕССИЯ КИСЛОРОД-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В СЕНЕСЦЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ТКАНЕВОМ УРОВНЕ ОКСИГЕНАЦИИ

Андрей Юрьевич Ратушный,
Людмила Борисовна Буравкова

ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем
РАН, Москва, Россия

ratushkin@mail.ru

Одним из основных проявлений старения организма является нарушение тканевого гомеостаза, поддерживаемого, в том числе, мезенхимальными стромальными клетками (МСК). Снижение регенеративной способности тканей с возрастом коррелирует со снижением

функциональной активности МСК, что диктует необходимость изучения механизмов клеточного старения.

С другой стороны, извлечение клеток из ткани для исследовательских и медицинских целей приводит к нарушению многих условий их тканевой ниши, в частности, уровня кислорода. В исследованиях *in vitro* было показано, что модификация микроокружения может значительно повлиять на физиологию этих клеток. Так, культивирование МСК при низком содержании кислорода приводило к изменениям пролиферации, миграции, дифференцировки, ангиогенного потенциала, что ставит вопросы о транскриптомном профиле сенесцентных МСК.

Целью работы было изучение экспрессии генов МСК, ассоциированных с реакцией на изменения уровня оксигенации, при репликативном старении в условиях тканевого (5%) и атмосферного (20%) уровней кислорода.

Полученные результаты указывают на то, что направленность транскрипционных изменений в МСК при достижении завершающей фазы репликативного старения однотипна, несмотря на различные условия оксигенации. Среди 84 изученных генов в сенесцентных МСК повышается экспрессия *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижается экспрессия *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP*. Тем не менее, на ранних пассажах можно обнаружить, что культивирование в гипоксических условиях (5%) может приводить к противоположной модификации экспрессии ряда генов, нежели репликативное старение. Если репликативное старение усиливало экспрессию *PKM2*, *SERPINE1* и подавляло *ANKRD37*, то культивирование МСК при 5% O₂ уже на ранних пассажах оказывало противоположный эффект, приводя с подавлению экспрессии *PKM2* и *SERPINE1* и усилению транскрипции *ANKRD37*. Это указывает на разнонаправленность эффектов, оказываемых репликативным старением и пониженным содержанием O₂, на транскрипцию генов, регулируемых HIF-1. Необходимо

отметить, что постоянное культивирование МСК при 5% O₂ не приводило к повышению экспрессии этого основного транскрипционного регулятора при гипоксии. При этом происходило снижение его экспрессии в несцентных клетках. Известно, что активность HIF-1 направлена на выживание клетки, поэтому ее снижение может быть одной из причин уменьшения жизнеспособных клеток при репликативном старении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00150.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В НЕЙРАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ И (ИЛИ) ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ

Мария Григорьевна Ратушняк¹, Галина Ароновна Посыпанова¹, Юлия Павловна Семочкина¹, Ольга Владимировна Высоцкая¹, Александр Иванович Глухов², Елизавета Юрьевна Москалева¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия;

² Первый государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

ratushnyak_marya@mail.ru

Чувствительность клеток к облучению определяется их способностью репарировать двуниевые разрывы (ДР) в ДНК. Активность репарации ДР в нейральных стволовых/прогениторных клетках (НСК/НПК) мыши после γ -облучения практически не изучена, хотя эти животные широко используются для анализа пострадиационных повреждений мозга. В связи с этим целью работы являлась характеристика радиочувствительности культивируемых НСК/НПК мыши и их способности к репарации ДР.

Культуру НСК/НПК получали из головного мозга мышей линии C57BL/6. НСК/НПК характеризовали с использованием моноклональных антител к нестину, β -тубулину III, глиальному фибриллярному кислом белку, маркеру зрелых олигодендроцитов O4, маркеру предшественников олигодендроцитов NG2 и по уровню активности теломеразы. Клетки облучали от источника ⁶⁰Co при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Количество ДР ДНК оценивали по уровню гистона γ H2AX в контрольных и облученных НСК/НПК в динамике после облучения с использованием флуоресцентно меченых антител к γ H2AX с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Анализировали также выживаемость клеток, уровень апоптоза и нарушение клеточного цикла.

Активность теломеразы практически отсутствовала при очень низком уровне экспрессии мРНК ее каталитической субъединицы mTERT. Облучение НСК/НПК в дозе 0,1 Гр не вызывало изменений ни в клеточном цикле, ни в уровне апоптоза, ни в выживаемости клеток, но приводило к повышению количества ДР ДНК. Облучение клеток в дозах 1–4 Гр уже через 6 ч приводило к блоку клеточного цикла и длительному повышению уровня апоптоза. Выживаемость НСК/НПК снижалась на 50% уже после облучения в дозе 1,2 Гр. Уровень ДР ДНК через 1 ч после облучения НСК/НПК в дозах 0,1–4 Гр возрастал пропорционально дозе. Обнаружена более медленная репарация ДР после облучения клеток в диапазоне малых (0,1 Гр) и низких (1 Гр) доз, которая завершалась только через 48 ч после облучения. После облучения в дозах 2 и 4 Гр репарация ДР ДНК была более быстрой

в первые часы и завершалась к 24 ч. В то же время было показано, что в НСК человека (линии ENStem-A и H9) способность к репарации ДР ДНК значительно выше: уровень γ H2AX возвращался к контрольным значениям уже через 2 ч после облучения (Acharya et al., 2010; Lan et al., 2012). Одной из причин высокой радиочувствительности НСК/НПК мыши может быть отсутствие (или очень низкая) активность теломеразы и низкая скорость репарации ДР ДНК.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1363 от 25.06.2019 г.).

МАКРОФАГАЛЬНАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И МИОКАРДЕ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА I ТИПА

Мария Сергеевна Ребенкова¹, Юлия Викторовна Роговская¹, Александра Энэевна Гомбожапова^{1,2}, Борис Ким¹, Вячеслав Валерьевич Рябов¹⁻³

¹ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН НИИ кардиологии, Томск, Россия;

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия;

³ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

kim_boris@list.ru

Введение. Развитие соматогенного делирия в ранние сроки после инфаркта миокарда является одним из значимых факторов, влияющих на частоту смертности пациентов. Однако причины и патогенез данного осложнения не изучены. Вероятно, что, как и при нейродегенеративных заболеваниях, в основе делирия лежит нейровоспаление, основными эффекторными клетками которого являются моноциты и макрофаги.

Цель: произвести количественную оценку инфильтрации CD68⁺ макрофагами в головном мозге и инфарцированном миокарде

Материалы и методы. Материалом послужили фрагменты головного мозга, и инфарцированного миокарда, полученные во время аутопсии пациентов умерших от инфаркта миокарда I типа, давностью до 3 суток (n=19). Критериями исключения являлись наличие нейродегенеративных, психических, инфекционных, онкологических заболеваний, инсульта или его последствий, смерть, не обусловленная инфарктом миокарда I типа. В качестве контроля были использованы фрагменты головного мозга и миокарда здоровых людей, умерших от несовместимой с жизнью травмы (n=10).

Макрофагальную инфильтрацию оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания с антителами к общему маркеру макрофагов CD68. Для визуализации исследованного маркера применялась система HRP-DAB. Подсчёт CD68⁺ макрофагов в срезах производился в светлом поле при оптическом увеличении $\times 400$ в 20 случайных полях зрения.

Результаты. Иммуногистохимическое исследование показало, что в контрольных образцах головного мозга и миокарда CD68⁺ макрофаги присутствовали в небольшом количестве. У пациентов, умерших в течение первых 3 суток инфаркта миокарда, количество CD68⁺ макрофагов в головном мозге (63,0 (20,0; 90,0)) превышало контрольные значения (4,00 (2,0; 6,0)) более чем в 15 раз (p<0,001). В инфарцированном миокарде количество

CD68⁺ макрофагов было почти в 3,5 раза больше (62,00 (52,0; 117,0)), чем в контрольной группе (17,0 (14,0; 24,0), $p < 0,001$). Количество CD68⁺ в головном мозге положительно коррелировало с количеством CD68⁺ макрофагов в инфарцированном миокарде ($R = 0,35$, $p = 0,03$).

Заключение. Показано увеличение количества CD68⁺ макрофагов в головном и инфарцированном миокарде в первые трое суток после инфаркта миокарда, наличие взаимосвязи между выраженностью макрофагальной инфильтрации в инфарцированном миокарде и головном мозге. Полученные данные свидетельствуют о развитии воспалительного ответа в головном мозге у пациентов с инфарктом миокарда I типа.

АДГЕЗИЯ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА (МСКЧ) И ПЕРВИЧНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ (ПЭФМ) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ НАНОПЛЕНКАХ

**Дмитрий Александрович Решетников,
Юлия Сергеевна Вершинина, Людмила
Михайловна Межевкина**

ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

no152304@gmail.com

Исследовано влияние синтетических полиэлектролитных нанопленок из полиэтиленimina (PEI), полиаллиламин гидрохлорида (PAH) и полистиролсульфоната натрия (PSS) на адгезию и пролиферативную активность мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека (МСКЧ) и первичных эмбриональных фибробластов мыши (ПЭФМ) в условиях пролонгированного культивирования *in vitro*. Нанопленки были собраны по методу электростатической адсорбции (layer-by-layer) на культуральном пластике (Nunc). Длительность культивирования клеток составляла от 5 до 7 суток. Выявлены межвидовые различия в эффективности адгезии и цитотоксичности полимерных материалов. Покрытие из PEI/PSS, где наружный слой был представлен полианионом PSS, препятствовало адгезии МСКЧ и клеток ПЭФМ, в результате чего они агрегировали в крупные конгломераты, не связанные с поверхностью, и быстро погибали по механизму некроза. В течение первых суток культивирования МСКЧ и ПЭФМ на нанопленках PSS обнаруживалось свыше 70% нежизнеспособных клеток с нарушенными барьерными свойствами плазматических мембран. Нанопленки из поликатионов PEI и PAH были адгезивны и не токсичны для обоих видов, однако при культивировании МСКЧ выявлялась сниженная по сравнению с контролем (культивирование на пластике) пролиферативная активность. В тоже время на пролиферацию мышечных фибробластов эти поликатионы оказывали значительное стимулирующее действие. При культивировании на пленках PAH были выявлены явные признаки изменения морфологии колоний, а также образование клеток с длинными и тонкими отростками по типу нейритов, что дает основание исследовать этот полиэлектролит как потенциальный фактор нейральной дифференцировки МСКЧ и ПЭФМ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОКТ ДЛЯ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА АРХИТЕКТУРЫ КОСТНОЙ ТКАНИ ОВЕЦ

Игорь Владимирович Ржепаковский¹, Александр Александрович Долгалев², Артур Ахматович Чагаров², Николай Николаевич Диденко²

¹ *Институт живых систем, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия;*

² *Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия*

78igorr@mail.ru

МикроКТ — это неразрушающий метод микроструктурного анализа, обладающий высоким уровнем детализации и позволяющий расширить возможности оценки внутренней архитектуры органов и тканей с применением 3Д анализа. В рамках исследования нами проведен микроКТ анализ различных костей овец в норме и при экспериментальном остеопорозе. У животных контрольной и опытной групп были отобраны костная ткань челюсти, подвздошные и бедренные кости. Образцы костных тканей, фиксировались в 10% забуференном формалине. Для сканирования и обработки материалов использовали рентгеновский микротомограф Skyscan 1176 (Bruker-microCT, Бельгия) и программное обеспечение Skyscan 1176 control program (1.0.0.0), Nrecon (1.7.4.2), DataViewer (1.5.6.2), CT-analyser (1.18.4.0), CTvox (3.3.Or1403). Сканирование каждой кости проводилось вместе с двумя фантомами (0,25 и 0,75 г/см³ гидроксиапатита кальция). В зависимости от размеров пробы и ее толщины использовалось разрешение от 9 до 36 мкм и два фильтра (Cu+Al и Cu 0,1 мм).

3Д визуализация подтвердила элиминацию трабекул в области метафиза бедренная кость с экспериментальным остеопорозом от центра к периферии, кроме того 3Д анализ показал снижение процента костной ткани на 15,1%, минеральной плотности на 7,8%, а также увеличение индексов, в частности Tb.Sp (trabecular separation), Tb.Pf (trabecular pattern factor) и SMI (structure model index) на 30,2%, 20,8% и 23,6%, соответственно и снижение индекса Tb.N (trabecular number) на 18,6%, что свидетельствует о вымывании кальция, понижении уровня связи между трабекулами и переходом их от пластинчатого к стержнеподобному типу архитектуры, что характерно для остеопороза.

Аналогичные изменения были обнаружены в результате 3Д анализа костной ткани челюсти животных при моделировании остеопороза, обнаружено снижение минеральной плотности на 18,9%, а также значительное увеличение индексов, в частности Tb.Pf и SMI на 11,58 и 2,21. 3Д анализ микротомографии подвздошной кости, также свидетельствует о моделировании остеопороза, что подтверждается достоверным увеличением основных индексов характеризующих развитие этой патологии Tb.Pf и SMI на 80,6% и 81,5%, соответственно.

Полученные результаты не только объективно свидетельствуют о развитии остеопороза у подопытных животных, но и указывают на признаки адаптационно-компенсаторных реакций организма. Характеризующихся появлением крупных единичных трабекул в области метафиза бедренной кости, а также не выраженным снижением минеральной плотности и площади костной ткани.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ

Светлана Алексеевна Родимова¹, Дарья Сергеевна Кузнецова¹, Николай Викторович Бобров^{1,2}, Дмитрий Георгиевич Реунов¹, Наталья Всеволодовна Вдовина¹, Владимир Евгеньевич Загайнов^{1,2}, Елена Вадимовна Загайнова¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

² Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия

srodimova123@gmail.com

Печень здоровых субъектов обладает высоким восстановительным потенциалом, однако при острой травме или фоновых заболеваниях данный потенциал значительно снижается. В связи с этим, важной задачей является оценка восстановительного потенциала печени с целью прогнозирования осложнений после резекционных вмешательств. Стандартные методы оценки структурно-функционального состояния печени (морфологический анализ, КТ, МРТ, УЗИ) не позволяют изучать процессы, происходящие в клетках печени в динамике в процессе регенерации. Современные методы мультиспектральной микроскопии в сочетании с FLIM (fluorescent lifetime imaging) расширяют возможности исследования структуры и метаболической активности клеток печени, благодаря своей неинвазивности, высокой чувствительности и отсутствию необходимости введения экзогенных красителей.

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar массой 400–500 г. Удаление левой доли печени — модель 30% гепатэктомии (30% ГЭ), удаление левой и медиальной долей печени — модель 70% гепатэктомии (70% ГЭ). Метаболический имиджинг проводили на 3 и 7 сутки после резекции. Для прицельного анализа метаболических процессов в гепатоцитах были получены значения окислительно-восстановительного отношения (ФАД/НАД(Ф)Н), а также времена жизни флуоресценции и их вклады свободной и связанной с белком формы НАД(Ф)Н и открытой и закрытой формы ФАД. Для оценки общей синтетической активности в клетках печени был представлен отдельный анализ НАДН и НАДФН. Исследование липидного состава ткани печени при регенерации проводили на крио-срезах методом масс-спектрометрии вторичных ионов ToF-SIMS 5 (ION-TOF, Германия). Образцы резецируемой печени исследовали в качестве контроля.

Результаты проведенного анализа показали усиление общей метаболической активности гепатоцитов с увеличением вклада процессов окислительного фосфорилирования в гепатоцитах, что может указывать на увеличение энергетических потребностей пролиферирующих клеток. Полученные параметры могут быть полезны в определении критериев восстановительного потенциала печени после операционных вмешательств.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00263.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕЙРОГЕНЕЗА ПОСЛЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ОБЩЕГО γ -ОБЛУЧЕНИЯ В МАЛОЙ ДОЗЕ И γ ,n-ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ

Алла Валерьевна Родина, Марина Юрьевна Копаева, Анастасия Николаевна Романцова, Валентина Георгиевна Шуватова, Елизавета Юрьевна Москалева

НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

alla.rodina@bk.ru

Известно, что действие высоких доз ионизирующего излучения на головной мозг вызывает угнетение нейрогенеза, определяемое гибелью радиочувствительной популяции нейральных стволовых и прогениторных клеток, нарушением образования новых клеток, что приводит к снижению способности к обучению и ухудшению памяти. В исследованиях влияния малых доз излучения на мозг показано его стимулирующее действие на пролиферацию и дифференцировку нейральных стволовых клеток и защитное действие по отношению к последующему облучению. Цель исследования — оценить влияние γ ,n-облучения головы и общего γ -облучения в малой дозе на нейрогенез в гиппокампе и когнитивные функции животных.

Мышей линии C57BL/6 облучали (⁶⁰Co) в дозе 0,1 Гр. Через 7 сут. проводили облучение головы в коллимированном пучке нейтронов и γ -квантов в дозе 1 Гр. Через 2 мес. после облучения вводили внутривенно 150 мг/кг BrdU, через 2 часа проводили перфузию и извлекали мозг. Влияние облучения на нейрогенез оценивали с помощью иммуногистохимического анализа парасагитальных срезов мозга по количеству BrdU-позитивных (маркер пролиферирующих клеток) и DCX-положительных (маркер нейробластов) клеток в зубчатой извилине гиппокампа. Влияние облучения на когнитивные функции исследовали в тесте «Водный лабиринт Морриса».

Обнаружено, что наибольшее количество DCX-положительных клеток образуется после сочетанного действия γ -облучения мышей в дозе 0,1 Гр и последующего γ ,n-облучения головы в дозе 1 Гр по сравнению с контролем и облучением в дозе 0,1 Гр. Меньшее по сравнению с контролем количество DCX-позитивных клеток наблюдалось после γ ,n-облучения головы в дозе 1 Гр. Не наблюдалось различий в количестве BrdU-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа у мышей, облученных в дозе 0,1 Гр, после γ ,n-облучения в дозе 1 Гр и контрольной группы. После сочетанного облучения количество BrdU-положительных клеток было повышено по сравнению с контролем. Таким образом, γ ,n-облучение в дозе 1 Гр приводило к подавлению нейрогенеза в гиппокампе через 2 мес. после облучения, а после сочетанного облучения наблюдалось восстановление нейрогенеза, но при этом было обнаружено нарушение пространственной ориентации и памяти. Можно заключить, что у мышей после предоблучения в дозе 0,1 Гр и γ ,n-облучения головы в дозе 1 Гр через 2 мес. продолжается нейрогенез в гиппокампе, но наблюдаемая положительная динамика еще не сопровождается полным восстановлением когнитивных функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-29-01033.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ХРЯЩА В ОРГАНОЙ КУЛЬТУРЕ С ПОМОЩЬЮ ТКАНЕВЫХ СФЕРОИДОВ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ КЛЕТОК НАДХРЯЩНИЦЫ РЕБРА

Сергей Александрович Родионов¹, Анна Александровна Грядунова², Валентина Клементьевна Ильина¹, Елена Владимировна Прохорова¹, Алексей Вадимович Волков¹, Михаил Михайлович Сморгчов¹, Николай Васильевич Загородний¹, Владимир Александрович Миронов^{1,2}, Алексей Вячеславонович Ковалев¹

¹ ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия;

² ЧУ «ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия

rodionov_085@mail.ru

Тканевые сфероиды — это плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы, способные к слиянию между собой с последующим формированием ткани, что позволяет использовать их для биофабрикации различных тканей и органов, в том числе суставного хряща. Для восстановления поврежденного суставного хряща применяют трансплантацию сфероидов из аутологичных культивированных хондроцитов (Spheroc, CoDon® AG). Пациенту проводят две артроскопические операции: первую — для забора биоптата суставного хряща, вторую — для трансплантации хондросфер. Это приводит к излишней травматизации сустава при заборе материала. Использование надхрящницы ребра в качестве источника клеток для формирования сфероидов призвано сократить количество и сложность оперативных вмешательств.

Материалом для исследования служили сфероиды, полученные из культивированных клеток надхрящницы ребра и суставного хряща овец. Сфероиды формировали путем культивирования клеток в агарозных планшетах (3D Petri Dish, Microtissues®) в течение 7 суток. Далее сфероиды помещали в дефекты суставных поверхностей, сформированные на фрагментах мышечков бедренных костей овец. Полученные комплексы культивировали в течение 7 суток. Проведено гистологическое и морфометрическое исследование сфероидов на разных сроках культивирования. Взаимодействие сфероидов с внеклеточным матриксом кости оценивали методами световой и сканирующей электронной микроскопии.

В результате нами были получены сфероиды из культивированных клеток надхрящницы ребра и суставного хряща. Каждый сфероид включал около 20 тыс. клеток. Средний эквивалентный диаметр сфероидов из суставного хряща уменьшался в процессе культивирования с 519 до 311 мкм, при этом у сфероидов из надхрящницы данный показатель увеличивался с 448 до 620 мкм. Сфероиды из суставного хряща на 7 сутки культивирования состояли из клеток, плотно прилежащих друг у другу, при этом сфероиды из надхрящницы включали элементы волокнистого внеклеточного матрикса.

В органной культуре были исследованы процессы тканевого слияния сфероидов и их адгезии к матриксу кости в дефекте. На 7 сутки культивирования сфероиды из клеток надхрящницы распластаются по поверхности дефекта, сливаются между собой и синтезируют внеклеточный матрикс быстрее, чем сфероиды из зрелых клеток суставного хряща. Таким образом, сфероиды из клеток надхрящницы имеют более высокий регенеративный потенциал по сравнению со сфероидными из клеток хряща. Кроме того, их получение не требует дополнительной артроскопической операции.

ИННОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С НИЗКОЙ ДОЗОЙ ПОГЛОЩЕНИЯ

Владимир Викторович Розанов^{1,2}, Анна Александровна Николаева^{1,3}, Игорь Васильевич Матвейчук², Александр Петрович Черняев¹

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва, Россия;

³ ФГАУ «НМИЦ Нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

naa90@mail.ru

Высокая эффективность и проникающая способность радиационной обработки обусловили её распространённость при стерилизации костных имплантатов [1]. МАГАТЭ в качестве стандартной рекомендована величина дозы 25 кГр. Однако облучение с дозой выше 15 кГр [2] может приводить к морфологическим изменениям биологических тканей.

Цель исследования: разработка инновационной технологии радиационной стерилизации костных имплантатов, обеспечивающей их стерильность при снижении величины радиационной дозы.

Эксперименты проведены в совместной (МГУ им. М.В. Ломоносова и ВИЛАР) Лаборатории биомедицинских технологий на имевших исходную контаминацию смешанной микрофлорой костных образцах (18×8×6 мм).

В работе предложена комбинированная двухэтапная технология стерилизации: на первом — обработка озono-кислородной смесью с последующей герметичной упаковкой образцов в стерилизованную той же газовой смесью термопленку; на втором — радиационное облучение, в эксперименте проведенное на линейном ускорителе электронов непрерывного действия в НИИ ядерной физики МГУ им. М.В. Ломоносова. Дозиметрический контроль поглощенной дозы выполнен с помощью пленочного детектора-дозиметра СО ПД (Ф)Р-5/50.

Метрологический контроль полученной облучаемыми образцами дозы (в эксперименте — 5, 11, 15, 23 и 27 кГр) осуществляли на основе математической оценки поглощенной дозы и регистрации её с применением пленочных дозиметров. Оценка погрешности определения поглощенной дозы выполнена с помощью программного пакета GEANT4.

Микробиологические исследования (тиогликолевая и среда Сабуро) показали, что только образцы, подвергнутые последовательному комбинированному воздействию озono-воздушной смесью и радиационному облучению с величиной поглощенных доз — 11, 15 и 27 кГр, стерильны на обеих культуральных средах.

Таким образом, инновационная технология [3], основанная на синергетике стерилизующих воздействий различной природы, позволяет обеспечить стерильность при значительном снижении величины дозы от радиационной обработки.

Литература:

1. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J. Radiol.* 2016; 8(4): 355–69.
2. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Лекишвили М.В. и др. Инновационные подходы к стерилизации костных имплантатов. *Технологии живых систем* 2015, 12(4): 74–6.
3. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К. и др. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов. Патент РФ № 2630464 от 08.09.2017.

**БИОМАТЕРИАЛЫ, ПРОЦЕССЫ И ПОЛЯ
В ТЕХНОЛОГИЯХ БИОФАБРИКАЦИЙ****Юрий Алексеевич Рочев***National University of Ireland, Galway, Ирландия*

yury.rochev@nuigalway.ie

Современные технологии биофабрикации включают в себя широкий спектр материалов и технологических процессов. При этом биосовместимость материалов во многих случаях определяется не только химической структурой материалов, но и методами формирования медицинского изделия или конструкции для тканевой инженерии. Нами показано, что характеристики изделий на основе одного из наиболее популярных биоразлагаемых сополимеров, применяемых в тканевой инженерии, на основе сополимера гликолида с L-лактоидом во многом зависят не только от химической композиции, т.е. соотношения лактида и гликолида, но и от методов формирования скаффолдов. На примере термочувствительных материалов с нижней критической точкой растворения (N-изопропилакриламид и его производные), нашедших применение в тканевой инженерии клеточных пластов, нами показано, что способ формирования термочувствительных покрытий во многом определяет их биосовместимость и функциональность. Приведенные примеры, однозначно показывают, что физико-химические процессы, лежащие в основе формирования скаффолдов (биофабрикация) сами по себе во многом определяют механические и биологические характеристики трехмерных тканеинженерных структур.

Наряду с новыми материалами и новыми методами формирования скаффолдов в последнее время стали развиваться технологии, получившие название «biophotomodulation» — биофотомодуляция. В основе этой технологии лежат стимулирующие эффекты низкоинтенсивного красного и далекого красного излучения на клетки, клеточные сфероиды и клеточные пласты. Поскольку данный диапазон соответствует «оптическому окну» биологических тканей, то данная технология дает возможность неинвазивного воздействия на клетки, иммобилизованные в скаффолдах. В частности, мы показали, что низкоинтенсивное красное излучение улучшает жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток, иммобилизованных в фибриновых скаффолдах. Полученные нами данные показывают, что наряду с био-материалами и ростовыми факторами, процессы биофабрикации играют определяющую роль в формировании аналогов тканей и органов. Мы полагаем также, что использование низкоинтенсивного красного и далекого красного излучения на клетки найдет дальнейшее развитие в тканевой инженерии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 15-15-00132) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-02-01248).

**НАВИГАЦИОННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ
В ПРОЦЕССАХ РОСТА СОСУДОВ И НЕРВОВ
И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ****Ксения Рубина¹, Екатерина Семина², Вероника
Сысоева¹, Всеволод Ткачук^{1,2}, Карина
Рысенкова², Полина Климович², Анна Шмакова¹**¹ *Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*² *НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва,
Россия*

rkseiniya@mail.ru

В современной биологии и медицине хорошо изучены морфогенетические процессы, происходящие в эмбриогенезе, однако меньше известно о генетических и эпигенетических механизмах построения архитектуры и поддержания целостности органов и тканей во взрослом организме и при регенерации. В основе регенерации лежит обеспечение кровоснабжением и иннервацией поврежденных тканей. Помимо основных молекул, регулирующих процессы ангио- и нейрогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, внимание привлекают навигационные молекулы, определяющие направление роста сосудов и нервов. Помимо контролирования траектории роста сосудов и нервов, навигационные молекулы играют важную роль при патологии.

T-кадгерин является навигационной молекулой негативного регулирования роста аксонов и миграции клеток нервного гребня в развивающейся нервной системе. Экспрессия T-кадгерина по времени и в пространстве совпадает с активизацией процессов васкуляризации в развивающемся головном мозге мышей. Во взрослом организме человека максимальная экспрессия T-кадгерина выявляется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии характерно для различных патологий, например, при атеросклеротическом поражении сосудов. T-кадгерин подавляет процессы как физиологического ангиогенеза, так и опухолевого неоангиогенеза. Различные нарушения экспрессии T-кадгерина в сосудах коррелируют с озлакачествлением новообразований кожи человека и меланомы.

Урокиназный рецептор (uPAR) также относят к навигационным молекулам. Ранее нами было показано участие uPAR в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудов. Нарушение экспрессии или функционирования uPAR коррелирует с различными патологиями нервной системы у мышей и человека. В культивируемых клетках нейронального происхождения uPAR экспрессируется на конусе роста аксонов. Блокирование uPAR нарушает миграцию нейрональных клеток в эмбриогенезе, направленный рост аксонов и их ветвление в культуре клеток Neuro2a и на модели роста аксонов в трехмерной модели спинальных ганглиев. Урокиназный рецептор оказывается необходимым для функциональной регенерации и восстановления структуры периферических нервов после повреждения.

Понимание фундаментальных вопросов регуляции ангио- и нейрогенеза необходимо как для разработки новых методов и подходов регенеративной медицины, так и для разработки новых лекарств для лечения онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 19-75-30007) и РФФИ (19-29-04118).

РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ПОДДЕРЖАНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОМ

Юрий Петрович Рубцов¹, Марат Самвелович Павлюков¹, Эдуард Константинович Писарев², Татьяна Олеговна Абакумова³

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

yrbtsov@gmail.com

В настоящее время роль длинных некодирующих РНК (lincRNA) в обеспечении основных клеточных функций, а также патогенезе многих, в том числе онкологических заболеваний не вызывает сомнений. Для отдельных lincRNA охарактеризованы молекулярные механизмы, показано, что lincRNA могут регулировать работу генов, входя в состав сложных комплексов с белками в составе хроматина, а также влиять на уровень и трансляцию мРНК, кодирующих белки — регуляторы клеточного деления, апоптоза и дифференцировки/поддержания стволовости. Нередко они связывают микроРНК, что позитивно влияет на трансляцию их мРНК-мишеней. Примером относительно хорошо изученной lincRNA является молекула lincROR, увеличение уровня которой в эмбриональных стволовых клетках связано с возрастанием количества в клетке транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентность (Oct4), а также со снижением уровня p53.

Мы предположили, что lincROR должна обладать важной функцией в стволовых клетках глиом, агрессивности которых и устойчивость к химиотерапевтическим препаратам зависит от состояния стволовых клеток и уровня регуляторов апоптоза. Кроме того, в предварительных экспериментах с первичными линиями глиом нам удалось выделить и частично охарактеризовать новую lincRNA, которая связывает важный регулятор апоптоза сурвивин (lincSURV). Мы полагаем, что уровень этой новой РНК должен коррелировать с фенотипом клеток глиом, поскольку количество этой новой регуляторной РНК выше в более агрессивных глиом с мезенхимным фенотипом, по сравнению с клетками менее агрессивного нейрального типа. Мы разработали подход, основанный на применении малых ингибиторных РНК для снижения количества lincROR и lincSURV в клетках глиом и доказали его эффективность. Альтернативный подход заключается в увеличении количества исследуемых некодирующих РНК в линиях глиом. Кроме того, по крайней мере одну РНК — lincROR- можно детектировать в составе внеклеточных везикул, что может свидетельствовать о её возможной передаче от одной клетки к другой.

Полученные нами результаты свидетельствуют о важной роли lincROR и новой lincSURV в регуляции стволовости и фенотипа клеток глиом.

Работа выполнена на средства гранта РФФИ 19-44-02027 RSF-DST(2018): Выяснение молекулярных механизмов, определяющих роль lincRNA в клетках глиобластомы.

МОНИТОРИНГ ОНТОГЕНЕЗА КРОВЕТВОРЕНИЯ И ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЕГО РАЗВИТИЯ И ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Станислав Александрович Рыбцов¹, Татьяна Николаевна Березина²

¹ Центр Регенеративной Медицины, Университет Эдинбурга, Соединенное Королевство;

² Московский Государственный Психолого-Педагогический университет, Москва, Россия;

srybtsov@ed.ac.uk

Пул CD34⁺ ГСК взрослых (гемопозитических стволовых клеток) и более специализированных предшественников ГСПК (гемопозитических стволовых и предшественники крови) однажды возникнув в ходе эмбриогенеза постоянно восполняет весь репертуар клеток крови взрослого организма и участвуют в поддержание и функционирование взрослой кроветворной системы. Миграция ГСК и ГСПС из фетальной печени во взрослую нишу (костный мозг) происходит на последних неделях беременности и сразу после рождения. Сравнительный анализ пуповинной крови новорожденных с периферической кровью индивидов различных возрастов, показывает экспоненциальное снижение ГСПК в крови во время взросления и последующего старения. С возрастом, также снижается количество предшественников моноцитов (Lin⁻CD34⁻CD16⁺CD14⁻), накапливается терминально-дифференцированные CD57⁺ клетки памяти (NK- и Т-клеток), а также CD4⁺CD25⁺ (Т-хелперы/Т-регуляторные клетки). Нарастает гранулярность нейтрофилов с увеличением экспрессии CD14 (ко-рецептора для TLR4 распознающего паттерны патогенов). Характерно, что снижение количества моноцитарных предшественников и накопление зрелых клеток памяти в крови с высокой степенью коррелируют с биологическим возрастом человека. Дальнейшие исследования предшественников и зрелых клеток в циркуляции, а также анализ крови индивидов, проживавших в разных климатических зонах, позволит создать не только надёжную классификация возрастных изменений иммунной системы человека, но и даст важный материал о особенностях дифференцировки ГСПК человека, формирования иммунной системы и особенностей старения под воздействием как генетических факторов, так и условий жизни и эпидемиологического окружения. Тестирование биологического возраста, физиологических характеристик, связанных со старением, включающих клинические показатели (артериальное давление, уровень инсулина, гемоглобина, статистическая балансировка, масса тела), в сочетании с самооценкой здоровья и психологическими особенностями (темперамент, память, показатели интеллекта) позволит оценить взаимозависимость возрастных изменений с параметрами иммунной системы. Целью является разработка подходов к мониторингу эффективности мероприятий по предупреждению заболеваний, связанных со старением иммунной системы, профилактикой аутоиммунных и иммунопролиферативных расстройств, а также преждевременного старения.

Работа выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 19-18-00058.

РОЛЬ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С УЧАСТИЕМ МИКРОРНК

Карина Дмитриевна Рысенкова^{1, 2}, Ксения Андреевна Рубина², Карина Александровна Иванова², Максим Николаевич Карагаюр², Екатерина Владимировна Семина^{1, 2}

¹ Лаборатория молекулярной эндокринологии НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

karina_ry@mail.ru

Раннее метастазирование опухолевых клеток является основным признаком прогрессии опухоли и частой причиной неудач в ее лечении. Известно, что повышенная экспрессия протеазы урокиназы uPA и ее рецептора uPAR сопровождает опухоли с высоким метастатическим потенциалом. Помимо самих опухолевых клеток, важную роль в канцерогенезе играют экзосомы, продуцируемые опухолевыми клетками, которые депонируются в опухолевой строме и могут перепрограммировать нормальные, не опухолевые клетки. Показано, что экзосомы метастазирующих опухолей несут на своей поверхности белки, регулирующие адгезию и миграцию клеток, в т.ч. интегрины, тетраспанины, uPA/uPAR комплекс и ряд других белков, remodelирующих внеклеточный матрикс. В состав экзосом опухолевых клеток входят также сигнальные белки, микроРНК и рецепторы факторов роста (напр. EGFR), которые могут изменять активность стромы. Ранее мы показали участие uPA/uPAR системы в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) клеток нейробластомы, который сопровождает метастазирование и опосредует ее химиорезистентность.

Мы установили, что выключение гена uPAR (Δ uPAR) методом CRISPR в клетках нейробластомы снижает их пролиферацию и запускает каспазо-зависимый апоптоз. Анализ экспрессии 84 микроРНК показал, что Δ uPAR сопровождается повышением экспрессии miR-34c-5p (в 3,4 раза) и снижением экспрессии miR-141-3p, miR-28a-5p, miR-291-3p и miR-295-5p (от 3,6 до 4,8 раз). Известно, что высокая экспрессия miR-34c-5p в нейробластоме связана с активацией протоонкогена MYCN и ее инвазией, что в данном случае может указывать на нежелательные эффекты нокаута uPAR, связанные с повышенным риском развития метастаз.

Используя биоинформатический анализ мишеней обнаруженных микроРНК, мы выявили кластеры генов-кандидатов, ответственных за ЭМП (*Snai1*, *Zeb2*), индукцию апоптоза (*Bcl6*, *p21*), пролиферацию (*Atf1*), адгезию и миграцию клеток (*CD93*, α v интегрин), а также участвующих в биогенезе экзосом (*TSPAN2*, *TSPAN11*, *Rab11b*, *Rab21*). Полученные нами результаты впервые свидетельствуют о том, что урокиназная система не только стимулирует пролиферацию самих опухолевых клеток и опосредует их метастазирование, но также может влиять на опухолевую строму за счет регуляции секреции экзосом и входящих в их состав микроРНК.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ (проект № 19-75-30007).

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КОЖНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИПСК ЧЕЛОВЕКА

Андрей Александрович Рябинин^{1, 3}, Екатерина Павловна Калабушева^{1, 2}, Элина Сергеевна Чермных^{1, 2}, Екатерина Андреевна Воротеляк¹⁻³

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

andrey951233@mail.ru

В настоящее время одним из перспективных направлений регенеративной медицины является технология генерации и пересадки живых эквивалентов кожи (ЖЭК). Данные трехмерные клеточные структуры можно использовать для терапии хронических воспалений и иных повреждений покровных тканей. Перспективным источником клеток для получения ЖЭК являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Технология создания ЖЭК имеет ряд нерешенных проблем, к которым относятся неполное соответствие структуры полученного ЖЭК своему нативному аналогу и отсутствие в нем кожных дериватов, участвующих в регуляции и самоподдержании кожного покрова.

Целью работы было получение в ходе направленной дифференцировки ИПСК человека и верификация клеточных линий, пригодных для получения аутологичного ЖЭК и генерации волосяных фолликулов *in vitro*. Полученные в ходе дифференцировки клеточные линии, аналоги кератиноцитов (ИПСК-Кц) и клеток дермальной папиллы волосяного фолликула (ИПСК-ДП) верифицировали при помощи выявления маркеров кератиноцитов (p63, K14, K18, K10 и др.) и маркеров клеток дермальной папиллы (версикана, виментина, фибронектина, гладкомышечного актина и др.) соответственно при помощи методов иммуноцитохимии и ПЦР в реальном времени. Для верификации ИПСК-ДП также проводили функциональный тест на индукцию фолликулогенеза *in vivo* после введения ИПСК-ДП под кожу иммунодефицитных мышей линии nude с последующим иммуногистохимическим выявлением эпидермальных маркеров (K6 и K14) в составе сформированных *de novo* кожных органоидов в препаратах, полученных из зоны введения для верификации линии ИПСК-ДП. На заключительном этапе работы ИПСК-ДП и ИПСК-Кц были задействованы для генерации ЖЭК в системе transwell и сфероидов, имитирующих ранние стадии фолликулогенеза, в системе «висячая капля». Образцы сформированных трехмерных клеточных структур использовали для иммуногистохимического выявления маркеров кератиноцитов (K14), клеток дермальной папиллы (фибронектина и версикана) и базальной мембраны (коллаген IV).

Результаты проведенной работы подтверждают целевой фенотип у полученных клеточных линий, а также демонстрируют, что ИПСК-ДП и ИПСК-Кц способны к интеграции в трехмерные клеточные системы. Этот факт позволяет предполагать, что разработанные методы и полученные клеточные линии могут быть в будущем применены для формирования полноценного ЖЭК с волосяными фолликулами *in vitro*.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 16-14-00204.

НОВАЯ ПОПУЛЯЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ СЕРДЦА ПЛОДОВ МЫШЕЙ GFP ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕРДЦА

Владимир Михайлович Рябов,
Ольга Владимировна Жидкова,
Борис Валентинович Попов

Лаборатория внутриклеточной сигнализации,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

voldemryabov@yandex.ru

Текущие публикации свидетельствуют о возможности трансдифференцировки МСК в кардиомиоциты. Для изучения такой возможности мы получили и охарактеризовали МСК из ткани сердца 19 дневных плодов мышей GFP. Для получения ткани сердца одну беременную мышью GFP умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Брюшную полость вскрывали в стерильных условиях, плоды в матке переносили в культуральную чашку, содержащую 10 мл PBS. Сердца плодов извлекали, переносили в стерильную культуральную чашку и измельчали ножницами до кусочков размером 1–2 мм. Полученные эксплантаты помещали в 60 мм культуральные чашки со средой DMEM, содержащей 20% ФБС, и культивировали в течение 2 недель в CO₂ инкубаторе при 5% CO₂ и 20% кислорода. Смену ростовой среды производили каждые 5–7 сут. Клетки, мигрирующие из эксплантатов, пассировали до 20 пассажа с последующей криоконсервацией в жидком азоте. В культуре МСК сердца плодов выявляли фибробласто-подобную морфологию и продуцировали зеленый флюоресцирующий белок (GFP), видимый в ультрафиолетовом свете. Для определения уровня клоногенности и спонтанной жировой дифференцировки 400 клеток сердца плодов на 8 пассаже высевали на 60 мм чашки и культивировали в среде DMEM в течение двух недель с последующей окраской красителем масляным красным. Клоногенность МСК сердца плодов составляла 8%, а уровень спонтанной жировой дифференцировки — 30%. В отличие от МСК костного мозга, которые служили позитивным контролем и дифференцировались в жировые и костные клетки, МСК сердца плодов были индуцибельны к жировой, но не костной дифференцировке. Для иммунофенотипирования из МСК сердца плодов экстрагировали тотальную РНК для амплификации мезенхимных и тканеспецифических маркеров с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. МСК сердца плодов экспрессировали мезенхимные маркеры, включая CD29, CD44, CD49D, CD49F, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, но не кроветворный маркер CD45. В отличие от ткани сердца плодов, в которой высоко экспрессировались тканеспецифические транскрипционные факторы Flk1, NKX2.5 и маркеры зрелых кардиомиоцитов SmMHC, TnTt, в недифференцированных МСК сердца плодов выявлялась на низком уровне только продукция Flk1 и TnTt. Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности использования МСК сердца плодов GFP в условиях кардиогенной дифференцировки для моделирования регенерации ткани сердца после экспериментального инфаркта миокарда.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы
Института цитологии РАН № 0124-2019-0004.

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

Сергей Иванович Рябов¹, Владимир Александрович Смирнов², Марина Александровна Звягинцева¹, Михаил Яковлевич Ядгаров¹, Сергей Александрович Базанович¹, Владимир Николаевич Смирнов¹

¹ ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России,
Институт экспериментальной кардиологии, Москва,
Россия;

² ГБУЗ НИИ Скорой помощи
им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

sir1601@mail.ru

Травма спинного мозга (ТСМ) является актуальной и не решенной проблемой современной медицины. В связи с постоянным ростом числа пострадавших, высоким уровнем смертности и инвалидизации, нужно проводить поиск эффективных методов лечения ТСМ. Клеточная терапия с применением мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПКЧ) может быть перспективной при лечении этой тяжелой патологии. Кривоконсервированные мононуклеарные клетки крови человека широко доступны и безопасны для применения в клинической практике.

Моделировали тяжелую спинную травму у крыс. Для клеточной терапии использовали кривоконсервированные МКПКЧ из криобанка, со сроком хранения от 1 года и больше, взятые у разных доноров. Клетки вводили однократно в хвостовую вену и в область повреждения. 2 млн клеток в 1 мл физиологического раствора внутривенно и такое же количество клеток внутриспинально в 10 мкл физиологического раствора. Оба способа введения клеток в период до 5 дней после травмы обеспечивали увеличение восстановления двигательной функции у крыс до 50% от уровня «самовосстановления» через 6 недель наблюдения. Восстановление функции происходило до 4–5 недели и далее стабилизировалось. Влияние введения клеток достоверно начинало обнаруживаться на 3 неделе. Клеточная терапия снижала объем травматического повреждения нервной ткани спинного мозга 2 раза через 6 недель после травмы, а достоверно разница обнаруживается на 2 неделе. Смертность крыс после травмы в контрольной группе «самовосстановления» составляла 19%, после введения клеток в 1 день после травмы составляла 16%, в 5 дня — 14%. Введение гентамицина снижало смертность до 10% в контроле. На фоне ежедневного введения гентамицина в течение 5 дней после травмы, введение клеток на 1 день и на 5 день после травмы снижало смертность до 4% и 1,5% соответственно.

Использование кривоконсервированные МКПКЧ показало себя достаточно эффективным средством клеточной терапии травматического повреждения спинного мозга в эксперименте.

НОВЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ УПРАВЛЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫМ МОРФОГЕНЕЗОМ

Ирина Николаевна Сабурина^{1,2}

¹ ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии,
Москва, Россия;

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования»
Минздрава России, Москва, Россия

saburinain@gmail.com

«Каждое новое поколение биологов продолжает находить свежие идеи или способы, чтобы заглянуть в будущее». В.С. Репин.

Формирование новых направлений регенеративной медицины тесно связано с исследованиями в области клеточных технологий. Разрабатываются методы модуляции регенеративных свойств тканей организма за счет стволовых клеток и клеток-предшественниц, а также создания на их основе тканеинженерных конструкций и биоэквивалентов для заместительной терапии и трансплантологии.

Однако важно помнить, что новые, инновационные методы восстановления гомеостаза тканей и органов тесно связаны с пониманием взаимодействия генома, транскриптома и протеома на разных уровнях организации от клеточного к тканевому. Данные взаимодействия реализуются через сложные регуляторные сети. Но без их понимания невозможен полноценный морфогенез. Морфогенез может проходить не только при эмбриогенезе и во взрослом организме, но также в клеточных культурах.

Поведение целой клетки — это интегральный итог упорядоченного поведения молекул и клеточных органелл — клеточный гомеостаз. В лабораторных условиях, когда приток информации к клеткам минимизируется, клетки способны длительно воспроизводить один и тот же архитектурный план. Способность клеток к спонтанному репрограммированию при сфероидогенезе при 3D культивировании соматических клеток человека, выделенных из разных органов и тканей, создает условия для управления клеточной дифференцировкой с помощью направленных индукционных сигналов. Возможность двойной направленной дифференцировки позволяет получить тканеинженерные конструкции на основе сфероидов или даже просто сфероидов без матрицы, в которых гармонично сочетаются функциональность и структура. Это открывает путь к созданию «заготовок органов» из индуцированных в нужном направлении сфероидов из соматических клеток самого реципиента из разных тканей для завершения морфогенеза в теле человека.

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Валерий Григорьевич Савченко

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России;
Москва, Россия;

savchenko.v@blood.ru

Аллогенная трансплантация костного мозга (алло-ТКМ) в настоящее время является единственным методом излечения многих заболеваний крови. Однако ее применение ограничено тяжелыми осложнениями, основным среди которых является реакция трансплантат против хозяина (РТПХ). В связи с недостаточной

эффективностью существующих методов профилактики РТПХ, активно исследуются новые, в том числе применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) донора.

В исследование по профилактике РТПХ было включено 206 пациентов. Они были рандомизированы на 2 группы: получавших стандартную профилактику оРТПХ (111 пациентов) и тех, кому дополнительно вводили МСК, полученные от донора костного мозга (95 пациентов). МСК вводили в дозе 1×10^6 /кг веса больного в день восстановления числа лейкоцитов до 1×10^9 /л. Лечение о РТПХ с помощью МСК было проведено для 36 пациентов в возрасте 19–60 лет, медиана 38 лет. Анализировали клинический эффект и характеристики МСК.

Показано, что профилактическое введение МСК, полученных из костного мозга донора гемопоэтических клеток больным острыми лейкозами в момент восстановления числа лейкоцитов после аллогенной трансплантации увеличивает общую, бессобытийную и безрецидивную выживаемость пациентов. Введение МСК от стороннего донора такого эффекта не оказывает. Это может быть связано с тем, что на МСК при попадании в организм начинают экспрессироваться антигены гистосовместимости II класса и клетки становятся иммуногенными. Утрачивая иммуноприлегированность МСК быстро выводятся из организма и не могут выполнять свои трофические и иммуномодулирующие функции.

При лечении глюкокортикостероид резистентной РТПХ с помощью МСК полный ответ был достигнут у 13 пациентов, частичный ответ у 9, клиническое улучшение у 4, и у 1 пациента наблюдался смешанный ответ. Девять пациентов не ответили на введение МСК, 8 из них не ответили на дальнейшие линии терапии и погибли менее чем через пол года. Более половины пациентов с полным и частичным ответом, а также с клиническим улучшением выжили. Остальные пациенты, имевшие клинический ответ, погибли через 1–49 месяцев после диагностики РТПХ в основном от рецидива основного заболевания. Эффективность терапии РТПХ не зависела от того были ли использованы МСК от собственного или стороннего донора и их основных характеристик.

Очевидно, что использование МСК имеет клинический эффект, для усиления которого необходимо дальнейшее изучение механизмов действия этих клеток и определение рамок их использования.

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ ПОДОБНЫМ МОНОЦИТАМ И МАКРОФАГАМ

Ирина Петровна Савченкова,

Екатерина Александровна Савченкова,
Юлия Алексеевна Осипова

Лаборатория стволовой клетки, Федеральный
научный центр — Всероссийский научно-
исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко
РАН, Москва, Россия

s-ip@mail.ru

Моноциты и тканевые макрофаги являются мишенью для многих лентивирусов животных. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в этом направлении представляет интерес для создания новой восприимчивой клеточной модели *in vitro* с целью изучения процессов, которые происходят во взаимоотношениях

клетка-вирус в результате лентивирусной инфекции. ЭСК являются уникальной моделью для изучения молекулярных механизмов клеточной дифференцировки, в частности раннего гематопоза. Условия дифференцировки ЭСК в макрофаги в культуре отличаются, и представляло интерес их оптимизировать. В качестве объекта использовали ЭСК мыши линии ДЗ. Индукцию к дифференцировке осуществляли посредством пассирования клеток в высокой плотности в чашках Петри без фидерного слоя. Колонии ЭСК собирали, не разбивая их, и высевали агрегатами (100–200 мкм в диаметре) в низкой плотности по 10–20 агрегатов на см² в чашки Петри, блокирующие клеточную адгезию с целью формирования эмбриональных телец (ЭТ), а в ростовую среду добавляли рекомбинантный интерлейкин 3 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. На 12 сут. такого культивирования ЭТ собирали и обрабатывали ферментами для получения отдельных клеток. Доля клеток, положительно окрашенных АТ против АГ CD34 и CD45, составляла 43% и 25%, соответственно. Для подтверждения дифференцировки в этом направлении использовали полужидкую метилцеллюлозную среду, в которую вносили те же рекомбинантные цитокины. Анализ полученных результатов продемонстрировал формирование колоний с различной морфологией с эффективностью 0,33% (33±0,4 на 10000 клеток). Иммуноцитохимический анализ выбранных по морфологии для анализа колоний продемонстрировал окраску клеток АТ против CD11b, CD11c, F4/80, что свидетельствует о получении в культуре моноцитов и тканевых макрофагов посредством индукции мышинных ЭСК. Обнаружение в колониях моноцитов и макрофагов, свидетельствует о том, что данные клеточные типы взаимосвязаны. Полученные результаты дают возможность изучать биологию этих клеток *in vitro* и открывают новые возможности для изучения зависимости репликации лентивирусов, в частности, вируса инфекционной анемии лошадей от степени цитодифференцировки.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КООРДИНАТОРЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИШИ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ

Георгий Дмитриевич Сагарадзе¹, Наталия Андреевна Басалова^{1,2}, Владимир Игоревич Кирпатовский^{1,3}, Дмитрий Александрович Обохотов^{1,2}, Петр Петрович Нимирицкий¹, Ольга Александровна Григорьева¹, Владимир Сергеевич Попов², Армаис Альбертович Камалов^{1,2}, Всеволод Арсеньевич Ткачук^{1,2}, Анастасия Юрьевна Ефименко^{1,2}

¹ Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

sagaradze_g@mail.ru

Стволовые клетки взрослого организма являются источником новых клеток для обновления и восстановления тканей. Постнатальные стволовые клетки функционируют в специфическом микроокружении, нише

стволовой клетки, в которой отдельные компоненты модулируют локальные и отдаленные регуляторные сигналы, передаваемые стволовым клеткам. Следовательно, повреждение ниши стволовой клетки может нарушить координацию гомеостаза и регенерации тканей. В роли координаторов восстановления ниши стволовой клетки можно рассматривать мезенхимные стромальные клетки (МСК) благодаря их потенциалу поддерживать жизнеспособность и регулировать функции резидентных клеток за счет секреции различных паракринных факторов и внеклеточных везикул. Кроме того, в некоторых случаях МСК могут брать на себя паракринную функцию поврежденных компонентов ниши для поддержания стволовых клеток и содействия регенерации ткани. Однако, механизмы восстановления ниши стволовых клеток и участия МСК в этом процессе остаются малоизученными.

Данное исследование посвящено изучению участия МСК в восстановлении ниши стволовой клетки. В качестве модели выбрана ниша сперматогонияльных стволовых клеток (ССК), поскольку ее состав охарактеризован, а также описаны механизмы паракринной регуляции поведения стволовых клеток и их микроокружения. На модели абдоминального крипторхизма у крыс вызывали повреждение ниши ССК. В результате экспериментов установлено, что инъекции под белочную оболочку яичка МСК или секрета МСК были достаточны для восстановления сперматогенеза и фертильности у животных и сопровождались увеличением количества клеток Сертоли, а также восстановлением секреторной функции клеток Лейдига.

Таким образом, в исследовании продемонстрировано, что МСК стимулируют восстановление ниши ССК за счет влияния на ключевые компоненты ниши. Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект опосредован секретом МСК. Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК могут имитировать функции утраченных поддерживающих клеток в нише стволовой клетки, временно обеспечивая паракринные стимулы для клеток-мишеней и тем самым поддерживая процессы регенерации тканей после повреждения.

*Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 19-75-30007; исследование роли МСК в восстановлении ниши ССК); РФФИ (№ 18-315-00403; эксперименты *in vitro* на клетках Лейдига и Сертоли).*

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У БОЛЬНЫХ С АБСЦЕССАМИ ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Дмитрий Игоревич Сажнев¹, Александр Алексеевич Андреев², Александр Анатольевич Глухов²

¹ БУЗ ВО Воронежская городская клиническая юльница скорой медицинской помощи 10, Воронеж, Россия;

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

dimitrikus@yandex.ru

Цель исследования: улучшить результаты лечения больных с абсцессами печени, путём повышения регенеративной активности гепатоцитов за счёт использования фотодинамического эффекта.

Материалы и методы: проанализированы результаты лечения 28 больных с абсцессами печени размерами от 5 до 10 см в диаметре. 14 из них составили основную группу, 14 – контрольную.

Больным производилось дренирование гнойника под УЗ-контролем дренажами 10–12 Fr. Содержимое активно аспирировалось. Полость промывалась физиологическим раствором. Пациентам основной группы после промывания в полость вводился фотосенсибилизатор (ФС) «Фотосен[®]», после чего дренаж перекрывался. Время экспозиции составляло 30 мин., после чего ФС аспирировался. Затем через дренаж проводилось оптическое волокно, и на полость воздействовали лазерным излучением. Источник излучения-аппарат лазерный терапевтический «Мустанг 2000». Длина волны составляла 675 ± 10 нм, мощность 180 мВт. Длительность сеанса облучения составляла 30 мин. В дальнейшем осуществлялась ежедневное промывание полости абсцесса 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюконата.

Пациентам контрольной группы после дренирования проводилось промывание полости физиологическим раствором и последующая ежедневная санация абсцесса 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюконата.

Результаты. Для оценки применяемой методики проводился контроль следующих параметров: сроки нормализации количества лейкоцитов, лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), результаты бактериологических посевов, уменьшение полости абсцесса по данным УЗИ.

У всех больных удалось достичь выздоровления, используя малоинвазивные интервенционные вмешательства. Нормализации уровня лейкоцитов в крови и снижение ЛИИ ниже 4 наблюдалась на 4 сутки у всех пролеченных больных основной группы. В контрольной группе данных показателей удалось достичь к 7–8 суткам. Отрицательные бактериологические посева в основной группе были получены к 3 суткам. У пациентов контрольной группы на 7–9 сутки. Уменьшение диаметра полости в 2 раза наблюдалось на 4–5 сутки у пациентов основной группы, в контрольной группе — на 7–8 сутки.

Заключение. Использование данного метода позволило ограничиться применением малоинвазивных пункционно-дренирующих вмешательств.

Благодаря ускорению некролитической фазы процесса и стимуляции грануляции уже к 2–3 суткам наблюдается улучшение общего состояния больных, которые субъективно отмечают купирование болевого синдрома и гипертермии.

ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В КАРЦИНОМЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Сергей Владимирович Сазонов¹,
Александр Александрович Бриллиант²,
Сергей Михайлович Демидов³**

¹ Кафедра гистологии Уральского государственного медицинского университета, Екатеринбург, Россия;

² Патолого-анатомическое отделение Института медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия;

³ Кафедра онкологии и радиологии Уральского государственного медицинского университета, Екатеринбург, Россия

prof-ssazonov@yandex.ru

Введение. Опухолевые клетки, имеющие высокую активность фермента ALDH1 обладают фенотипическими и функциональными характеристиками стволовых клеток, а при культивировании дают популяцию опухолевых стволовых клеток. В то же время нет данных о величине популяции этих клеток в карциномах молочной железы из разных иммунобиологических подтипов.

Материал и методы. В работе использовался материал 110 случаев инвазивной карциномы молочной железы. Для определения стволовых клеток в опухолевой популяции исследовали наличие ALDH1A1. Для распределения на иммунобиологические подтипы определяли наличие рецепторов к стероидным гормонам ER, PR, HER-2/neu рецепторы, а также уровень экспрессии белка Ki-67. Сформированы группы карцином гормон-рецептор-позитивного: люминального А и В подтипов и гормон-рецептор-негативного: тройного негативного и Her2 — позитивного подтипа.

Результаты. В группе с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток преобладают случаи гормон-рецептор-негативного HER-2 позитивного и Тройного негативного подтипов (46 и 37% соответственно). В 96% случаев Люминального А подтипа и в 100% случаев Люминального В подтипа опухолевые стволовые клетки выявлялись в незначительном количестве. Наибольшее число случаев, в которых выявлено более 10% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток, относились к Гормон-рецептор негативному HER-2 позитивному (20%), гормон-рецептор позитивному HER-2 позитивному (12%) и тройному негативному подтипам (17%). В последней группе все случаи с высоким уровнем экспрессии ALDH1A1 содержали более 50% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток.

Выводы. Наибольший размер популяции опухолевых стволовых клеток обнаружено в гормон-рецептор-негативных карциномах молочной железы (случаи HER-2 позитивного и тройного негативного подтипов). Эти же подтипы считаются наиболее неблагоприятными по прогнозу и ответу на химиотерапию.

Работа выполнена в рамках Государственного задания УГМУ № 056-00151-18-00.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬСЯ В НЕЙРАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ

**Диана Ирековна Салихова¹, Георгий Евгеньевич
Леонов¹, Татьяна Борисовна Бухарова¹, Наталья
Вадимовна Булатенко¹, Олег Владимирович
Махнач¹, Андрей Витальевич Макаров^{1,2},
Тимур Хайсамудинович Фатхудинов^{2,3},
Дмитрий Вадимович Гольдштейн^{1,3}**

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт Морфологии человека», Москва, Россия;

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

diana_salikhova@bk.ru

На сегодняшний день технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) является весьма перспективной для применения в клинической практике, поскольку позволяет исключить использование фетального материала, а также проблемы, связанные с наработкой биоматериалов. Постоянное совершенствование методов получения ИПСК и направленный отбор клонов приведет к более широкому применению производных плюрипотентных клеток для создания терапевтических препаратов и тканеинженерных конструкций.

Целью работы является получение ИПСК методом репрограммирования фибробластов человека и отбор перспективных клонов для дальнейшей дифференцировки в нейральном направлении.

Материала и методы. Для получения ИПСК из фибробластов от двух доноров использовали коммерческий набор для репрограммирования «CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit» на основе вируса Сендай. Все полученные линии были охарактеризованы по экспрессии маркеров плюрипотентности иммуноцитохимическим методом, а также с помощью ПЦР-анализа. Для подтверждения способности полученных клонов ИПСК человека к дифференцировке *in vitro* был проведен тест на спонтанное формирование трех зародышевых листков. Дифференцировку в нейральном направлении проводили с помощью малых молекул SB431542, 2 мкМ дорсоморфина и 200 нМ LDN193189 в течение 14 суток. Количество дифференцированных клеток определяли по маркеру нейроэпителлия PAX6 с помощью точной цитометрии.

В результате отбора были получены стабильные линии ИПСК — VII_MAK_C, VI_MAK_A, V_MAK_F от первого донора, которые подтвердили свой плюрипотентный статус посредством экспрессии генов-маркеров Oct4, Sox2, Nanog, TRA-1-81 как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, а также способность к спонтанному формированию три зародышевых листка, и имели нормальный кариотип.

На следующем этапе была выбрана линия — VII_MAK_C, которая после дифференцировки состояла на $98,4 \pm 0,6\%$ из нейральных стволовых клеток (PAX6⁺). В то время как в линиях VI_MAK_A и V_MAK_F количество PAX6⁺ — клеток составляло $46,6 \pm 10,16\%$ и $52,4 \pm 4,56\%$, соответственно. Таким образом было показано, что полученные клоны ИПСК обладают разной способностью к нейральной дифференцировке. Анализ гетерогенности культур по экспрессии PAX6⁺ клеток позволит выбрать линии с наибольшим терапевтическим потенциалом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор научного проекта RFMEFI60417X0184.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС

**Игорь Валерьевич Саматосенков¹,
Маргарита Николаевна Журавлева²,
Юрий Александрович Челышев¹**

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

mr.samatoshenkov@mail.ru

На модели хронической ишемии задней конечности крысы изучены эффекты инъекции аденовирусов, несущих гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF 165), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и ангиогенина (ANG). Спустя 14 суток после создания ишемии путем иссечения фрагмента бедренной артерии крысы были разделены на 4 группы: (1) группа с введением гена ANG (Ad5-ANG, n=10; 2×10^{10} вирусных частиц в 60 мкл NaCl) в 4 точки дистальной части икроножной мышцы, по 15 мкл в каждую точку; (2) группа с введением комбинации генов VEGF

и ANG (Ad5-VEGF+Ad5-ANG, n=10) в том же объеме в те же точки; (3) группа с введением комбинации генов VEGF, ANG, GDNF (Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF, n=10); (4) группа контроля с введением физиологического раствора (NaCl, n=10). Для оценки экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) были дополнительно прооперированы 5 животных с введением на 14 сутки после операции в дистальную часть икроножной мышцы Ad5-EGFP. Забор биоматериала осуществляли на 14 и 28 сутки после проведения генной терапии. Для идентификации кровеносных сосудов и оценки состояния мышечной ткани осуществляли иммуногистохимическую реакцию с антителами против CD 31, морфометрический анализ мышечных волокон и подсчет мышечных трубочек с центрально расположенными ядрами (МЦЯ). Для оценки экспрессии терапевтических генов и специфических белков выполняли ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и вестерн-блоттинг (WB). На 28 сутки после введения генов количество МЦЯ в области ишемии мышцы, а также количество CD31-иммунопозитивных клеток в группе Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF было увеличено в 38.7 и 1.3 раза соответственно. Методом ПЦР-РВ на 14 сутки показано увеличение мРНК GDNF, VEGF и ANG как в группе Ad5-VEGF+Ad5-ANG, так и в группе Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF, также отмечено увеличение экспрессии мРНК desmin в области ишемии мышц в этих группах. Методом вестерн-блотта было показано увеличение экспрессии CD34 и фактора фон Виллебранда (VWF) на 14 сутки после инъекции Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF при сравнении с контрольной группой. Введение комбинации Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF стимулирует регенерацию мышц, увеличивая количество МЦЯ, а также увеличивает количество сосудов. Исходя из вышеприведенных данных, ангиогенный и регенераторный потенциал генетической конструкции Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF требует дальнейшего исследования для возможности его применения в клинических целях в качестве средства, стимулирующего ангиогенез и регенерацию скелетной мышцы при ишемии.

БИОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

**Наталья Борисовна Сапунова, Алена
Олеговна Богатырева, Надежда
Викторовна Ревина, Елена Владимировна
Лияськина, Виктор Васильевич Ревин**

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

n.sapunowa2016@yandex.ru

Бактериальная целлюлоза (БЦ) имеет большие перспективы использования в качестве биоматериала для регенеративной медицины. Она обладает такими свойствами как биологическая совместимость, высокая механическая прочность, высокая сорбционная способность. Гель-пленка БЦ поддерживает оптимальный баланс влажности, стимулирующий заживление; отлично пропускает жидкости и газы; поглощает продукты распада тканей; служит почти непреодолимым физическим барьером для инфекции. Это уникальная матрица-носитель для различных лекарственных препаратов, в частности с антибактериальным и регенерирующим действием. Особый интерес к БЦ вызван возможностью получения

на ее основе биокомпозиционных материалов с заданными свойствами.

Целью работы было получение новых биоматериалов с антибактериальными и регенеративными свойствами на основе БЦ.

Объектом исследования являлась очищенная БЦ, полученная при культивировании бактерии *Glucopacetobacter sucrofermentans* В-11267 на среде HS и средах с отходами пищевой промышленности.

В результате исследований получены биокомпозиаты на основе пленок, гидрогелей и аэрогелей БЦ с хитозаном и альгинатом. Изучены их физико-химические и физико-механические свойства. Показано, что полученные биоматериалы обладают высокой антибактериальной активностью и регенеративными свойствами.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект госзадания № 11.10882.2018/11.12.

КУПИРОВАНИЕ IMIQUIMOD-ИНДУЦИРОВАННОГО ПСОРИАЗА У КРЫС СЕКРЕТОМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Марина Владиславовна Сарычева², Полина Александровна Голубинская^{1,2}, Сергей Викторович Надеждин², Юрий Евгеньевич Бурда^{1,2}

¹ Центр клеточных технологий Бирюч, Белгородская обл., с. Малобыково, Россия;

² Белгородский национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

dr.sarycheva@mail.ru

Антипсориазная терапия в последние годы претерпела изменения, появилось большое количество генноинженерных биологических препаратов: анти-TNF- α — etanercept, infliximab и adalimumab, анти-IL12/IL23 p40 — ustekinumab, анти-фосфодиэстераза-4 — apremilast, анти-IL-17A — secukinumab, ixekizumab, PDE4 ингибитор apremilast. В топических препаратах прогресс значительно меньше, основными средствами, по-прежнему, остаются глюкокортикоиды с известными побочными эффектами, аналоги витамина D — calcipotriol (calcipotriene), производное ретиноевой кислоты — Tazarotene, березовый деготь, имеющие более узкие показания.

Материалы и методы. Исследование проводили на модели имицимод-индуцированного псориазiformного воспаления на крысах линии Wistar. После развития воспаления на спине одну сторону ежедневно мазали контрольным препаратом — детский крем, вторую — детским кремом с добавлением секрета крысиных костномозговых МСК. Вместо опытного препарата у части крыс использовали в качестве референтного препарата фторцинолон. Кожные некропии с окраской гематоксилин/эозин подвергли морфометрии.

Результаты. На 4 день применения имицимод у всех животных наблюдалось развитие воспаления, с появлением крупнопластинчатого шелушения, эксфолиаций, равномерно с обеих сторон в области применения индуктора воспаления. Купирование воспаления в результате ежедневного однократного применения крема, крема с секретом МСК и fluocinolone наблюдалось в опытной группе и в положительном контроле со 2 дня применения, в отрицательном контроле на 3 сутки применения крема внешне выраженность воспаления снижалась

незначительно. Так общая клеточность препаратов в отрицательном контроле составила $876,9 \pm 77,5$ (M \pm sd), в положительном контроле — $572,8 \pm 75,4$, а в опытной группе — $589,4 \pm 105,4$. Толщина дермы в мкм в контроле — $893,0 \pm 71,1$, при использовании fluocinolone acetate — $607,8 \pm 83,7$, а в случае применения секрета МСК — $629,1 \pm 48,0$. Также под влиянием факторов, продуцируемых МСК, статистически значимо уменьшался такой характерный для псориаза признак, как акантоз: $253,6 \pm 35,9$ мкм, против $252,0 \pm 54,8$ мкм под влиянием fluocinolone acetate и $677,1 \pm 80,6$ мкм в отрицательном контроле.

Таким образом, противовоспалительная и иммуносупрессивная активность комплекса гуморальных факторов секрета МСК обеспечила купирование острого псориазiformного кожного воспаления и показала потенциал для дальнейшего углубленного экспериментального исследования в лечении Th17-зависимого воспаления.

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ КЕРАМИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПИРОФОСФАТА КАЛЬЦИЯ

Татьяна Викторовна Сафронова¹, Андрей Сергеевич Киселев¹, Татьяна Борисовна Шаталова¹, Ярослав Юрьевич Филиппов¹, Владимир Валентинович Зайцев², Ирина Ивановна Селезнева³

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова», Москва, Россия;

³ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской области, Россия

t3470641@yandex.ru

Биосовместимые биорезорбируемые (биodeградируемые) керамические материалы на основе фосфатов кальция необходимы для развития новых методов лечения дефектов костной ткани. Преимуществом костных имплантатов на основе синтетических неорганических материалов является отсутствие иммунной реакции отторжения организмом по сравнению с ксеиноимплантатами или аллотрансплантатами, а также исключение дополнительной травматичности, присущей «золотому стандарту» имплантации при использовании аутоимплантатов.

Целью настоящей работы было создание новых биосовместимых биорезорбируемых (биodeградируемых) керамических материалов на основе пирофосфата кальция $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ и исследование их биосовместимости.

Керамику на основе пирофосфата кальция $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ получали из синтетических порошков гидрофосфатов кальция (CaHPO_4 , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), используя в качестве спекающей добавки полифосфат кальция $(\text{Ca}(\text{PO}_3)_2)$ в количестве 0–10%.

Метаболическая активность клеток была определена по результатам МТТ-теста при инкубации в течение 48 часов в вытяжках из исследуемых керамических материалов. Результаты определения жизнеспособности клеток, культивируемых на поверхности исследуемых материалов на вторые и на седьмые сутки, подтверждают, что пролиферативная активность клеток наблюдается на всех исследованных образцах.

Было установлено, что исследуемые образцы керамики на основе пирофосфата кальция не вызывали

воспаления и не подвергались резорбции будучи имплантированными в подкожную клетчатку мелкого лабораторного животного (крысы линии «Wistar») по истечении 30 дней. Локальная реакция организма на образцы, имплантированные животным, была минимальной, поскольку отсутствовал выраженный фиброз соединительно-тканной капсулы. Вокруг всех имплантированных плотных образцов образовывалась тонкая и прозрачная соединительно-тканная капсула. Исследованные материалы вызывали слабовыраженный неоангиогенез.

Исследования *in vitro* и *in vivo* подтвердили биосовместимость керамики на основе пирофосфата кальция. Керамические материалы на основе пирофосфата кальция могут быть рекомендованы для изготовления костных имплантатов и дальнейшего развития регенеративных методов лечения дефектов костной ткани.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11079.

БИОСОВМЕСТИМЫЕ КальцийФосФатные Керамические материалы, полученные обжигом цементного камня

Татьяна Викторовна Сафронова¹, Отабек Улугбекович Тошев¹, Татьяна Борисовна Шаталова¹, Юлия Сергеевна Лукина², Константин Викторович Малютин³, Ярослав Юрьевич Филиппов¹, Владимир Валентинович Зайцев⁴, Ирина Ивановна Селезнева⁵, Валентина Константиновна Крутько⁶, Ольга Николаевна Мусская⁶

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;

³ Московский политехнический университет, Москва, Россия;

⁴ ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова», Москва, Россия;

⁵ ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

⁶ ГНУ «Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

t3470641@yandex.ru

Материалы на основе фосфатов кальция используются в качестве лекарственных средств при лечении дефектов костной ткани. Керамика на основе пирофосфата кальция $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ привлекает внимание исследователей из-за способности резорбироваться в среде организма, а так же из-за близкого к нейтральному для этого материала уровня pH при имплантации. Фаза пирофосфата кальция в керамическом материале может быть превнесена через прекурсоры с молярным соотношением Ca/P=1: $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Целью работы было создание нового керамического материала на основе пирофосфата кальция, полученного обжигом цементного камня, и исследование биосовместимости этого материала.

При добавлении воды к порошковой смеси, включающей цитрат кальция тетрагидрат $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и монокальцийфосфат моногидрат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, происходило формирование цементного камня. Высококонцентрированные водные суспензии на основе этой порошковой смеси обладали продолжительным

(до 30 мин.) периодом твердения, что позволило использовать эти суспензии для экструзионной 3D-печати образцов с заданной геометрией порового пространства. Фазовый состав образцов после формования, твердения и сушки был представлен бруситом $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и монетитом CaHPO_4 , а после обжига — пирофосфатом кальция $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Исследуемые образцы керамики на основе пирофосфата кальция, как было установлено, не вызывали воспаления и не подвергались резорбции будучи имплантированными подкожно мелким лабораторным животным (крысы линии «Wistar») по истечении 30 дней. Вокруг всех имплантированных плотных образцов образовывалась тонкая и прозрачная соединительно-тканная капсула. Локальная реакция организма на образцы, имплантированные животным, была минимальной, поскольку отсутствовал выраженный фиброз соединительно-тканной капсулы. Исследованные материалы вызывали слабовыраженный неоангиогенез.

Исследования *in vivo* подтвердили биосовместимость керамики на основе пирофосфата кальция $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, полученной обжигом цементного камня. Высококонцентрированные суспензии, включающие цитрат кальция тетрагидрат $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и монокальцийфосфат моногидрат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, могут быть использованы для экструзионной 3D-печати, а полученные керамические материалы на основе пирофосфата кальция могут быть рекомендованы для изготовления костных имплантатов и развития регенеративных методов лечения дефектов костной ткани.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-53-00034) и БРФИ (проект № X18P-063).

ПРИМЕНЕНИЕ ПОВЯЗОК НА ОСНОВЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КОЛЛАГЕНА I ТИПА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДОНОРСКИХ РАН В КОМБУСТИОЛОГИИ

Алексей Владимирович Сачков, Наталья Валерьевна Боровкова, Никита Евгеньевич Пидченко, Александр Сергеевич Миронов, Тамара Георгиевна Спиридонова, Елена Александровна Жиркова, Кирилл Всеволодович Светлов, Михаил Анатольевич Мигунов, Александр Олегович Медведев

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы» Москва, Россия

PidchenkoNE@sklif.mos.ru

Введение. Аутодермопластика — основной метод пластического закрытия глубоких ожогов. Донорские раны являются моделью ожогов II степени, для лечения которых мы применяем повязки на основе лиофилизированного человеческого коллагена I типа.

Цель. Улучшить результаты лечения донорских ран.

Материал и методы. 26 больных поступили в ожоговый центр в 2018–2019 гг. с глубокими ожогами кожи. Всем больным выполнена аутодермопластика расплеченными аутоотрансплантатами толщиной 0,3–0,4 мм, взятыми роторным дерматомом. Донорские раны закрывали: 16 больным лиофилизированным человеческим коллагеном I типа (1 группа), а 10 — атравматическим сетчатым покрытием (традиционное лечение, 2 группа). Раневые покрытия фиксировали марлевым бинтом.

Больные обеих групп были сопоставимы по полу, возрасту, площади ожоговых ран.

Оценивали сроки эпителизации донорских ран в обеих группах. Данные представлены в формате медиан (Me) и квартилей (LQ; UQ). Сравнительный статистический анализ проводили с применением критерия Манна-Уитни. За уровень статистической значимости принято $p \leq 0,05$.

Результаты. Первую перевязку в обеих группах проводили на 5 сутки.

В 1 группе марлевая повязка не прилипала к ране, покрытой деградирующим коллагеном и тонким сухим «кровяным струпом». Струп постепенно отторгался по мере эпителизации, а рану вели открытым способом.

Во 2 группе сухая марлевая повязка была плотно соединена с атравматическим покрытием и раной. Проводили ежедневную смену марлевых повязок до полной эпителизации ран. Перевязки сопровождались незначительным кровотечением и выраженной болью.

В 1 группе срок эпителизации донорских ран составил от 8 до 10 суток — 9(8; 9). Во 2 группе — от 10 до 12 суток — 10,5 (10; 11), что статистически значимо больше, чем в 1 группе ($p < 0,001$).

Заключение. Известно, что при повреждении ткани происходит естественная активация тромбоцитов, которые выделяют факторы роста. Они вызывают миграцию фибробластов в область раны и ускоряют пролиферацию эпителия сохранившихся дериватов кожи. Экзогенный коллаген, являясь матриксом, ускоряет миграцию фибробластов и кератиноцитов. Предложенный нами метод лечения донорских ран с применением лиофилизированного человеческого коллагена I типа позволил статистически значимо сократить сроки их эпителизации.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ

Галина Викторовна Селедцова¹, Ирина Петровна Иванова¹, Юрий Анатольевич Кожевников¹, Сергей Николаевич Белогородцев²

¹ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Москва, Россия;

² ФБГНУ НИИ туберкулеза, Москва, Россия

gvs1502@mail.ru

Формирующийся в процессе хронического инфекционного процесса дефект костной ткани (секвестральная коробка) является местом длительного персистирования микроорганизмов, что приводит к хронизации процесса. Периодические обострения сопровождаются вовлечением новых участков кости и окружающих тканей в патологический процесс и, в дальнейшем, приводят к грубому нарушению функции органа и инвалидизации больных.

Существующие хирургические и терапевтические методы не всегда позволяют полноценно восстановить дефект кости при остеомиелитическом процессе. Поэтому поиск новых технологий лечения в остеоиммунологии — актуальная для практического здравоохранения задача. В нашей работе в качестве прорегенераторного стимула были использованы аутологичные мезенхимальные стволовые клетки, которые способны дифференцироваться в клетки костной ткани и как непосредственно замещать дефект (E. Seebach, 2015, И.В. Майбородин, 2011), так и вырабатывать широкий спектр цитокинов, оказывающих иммуностимулирующее действие.

Результаты. Для лечения пациентов использовали аутологичные мезенхимальные клетки, полученные

из популяции костномозговых клеток при культивировании в течение 3–4 недель.

Всего пролечено 24 пациента (7 больных с остеомиелитом бедренной кости и 17 пациентов с остеомиелитом большеберцовой кости). Все больные имели срок заболевания более 2 лет, неоднократно проходили лечение по поводу рецидивов хронического остеомиелита, либо имели незакрывающиеся свищевые ходы с отделяемым. У всех больных в зоне остеомиелитического очага имелись множественные послеоперационные рубцы, трофические нарушения. Сроки наблюдения больных составили от 1 до 10 лет после трансплантации. В сроки 6 месяцев и 1 год проводилось Rg-логическое исследование. Отсутствие рецидива местного воспалительного процесса отмечено у 18 из 24 больных. Во всех случаях был отмечен выраженный трофический эффект трансплантации мезенхимальных стромальных в виде заживления трофических язв (3 случая), изменения цвета кожных покровов в области очага, а также уменьшение болевого синдрома. У всех больных, независимо от ремиссии или возобновления воспалительного процесса по рентгенографическим данным отмечено частичное или полное заполнение остеомиелитической полости костной тканью. Кроме того, отмечалось увеличение рентгенологической плотности костной ткани. Вмешательство было безопасным, не зафиксировано аллергической реакции, инфекционных осложнений в месте введения, кровотечения.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Наталья Юрьевна Семенова¹, Виктор Иванович Ругаль¹, Анна Вадимовна Чубарь^{2,3}, Натэлла Иосифовна Енукашвили^{2,3}, Сергей Васильевич Грицаев¹, Иван Иванович Кострома¹, Анастасия Андреевна Жернякова¹, Станислав Семенович Бессмельцев¹

¹ ФГБУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

natyciel87@gmail.com

Множественная миелома (ММ) — распространенный вид моноклональных гаммапатий, заболеваемость которой неуклонно возрастает. Рост и развитие опухоли опосредуется взаимодействием опухолевых клеток с микроокружением костного мозга (КМ), в котором мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются важнейшими участниками гемопоетической ниши. Изучение особенностей МСК КМ необходимо для проразрешения механизмов поддержки роста опухоли и развития резистентности к лечению.

Цель работы: сравнить свойства МСК КМ здоровых доноров и пациентов с ММ при разной степени инфильтрации КМ.

Первичные культуры МСК КМ получали из материала стерильной пункции 2 здоровых доноров (ЗД) и 12 пациентов с ММ, после лечения (химиотерапия по схемам VD, CVD, АутоТГСК). Пациенты были разделены на группы в зависимости от степени инфильтрации (ИНФ) КМ опухолевыми клетками: низкая степень ИНФ (интерстициальная ИНФя КМ, менее 6% плазматических клеток (ПК)

в аспирате) и высокая (диффузная ИНФ КМ, 6–82% ПК в аспирате). Определяли следующие параметры МСК: иммунофенотип, пролиферативную активность, способность к остеогенной дифференцировке, наличие признаков опухоли-ассоциированного фенотипа (синтез гладкомышечного актина (α -ГМА), β -галактозидазы (β -gal)). Для оценки влияния клеток миеломы на свойства МСК проводили бесконтактное сокультивирование с клетками линии RPMI-8226, после чего определяли концентрацию цитокинов (IL-10, IL-6, VEGF) в культуральной среде.

Иммунофенотип МСК КМ пациентов с ММ не отличался от иммунофенотипа МСК КМ ЗД, однако показано снижение пролиферативного потенциала (в среднем в 2,4 раза). Отмечалось снижение остеогенного потенциала МСК КМ пациентов с ММ по сравнению с МСК ЗД. Прослеживалась корреляция с типом ИНФ КМ: культуры МСК КМ пациентов с ММ с низкой степенью ИНФ сохраняли способность к остеогенной дифференцировке, культуры МСК КМ пациентов с высокой степенью ИНФ КМ показали снижение по этому параметру.

По сравнению с ЗД при ММ происходит увеличение уровня синтеза α -ГМА, причём при низкой степени ИНФ КМ количество положительных культур составляет 25%, а при высокой — 75%. Цитокиновый профиль МСК КМ после сокультивирования с миеломными клетками различался в зависимости от тяжести заболевания.

У больших ММ нарушения структурной организации гемопозитической ниши и функциональных свойств МСК могут быть ключевыми факторами неопластической трансформации лимфоидных предшественников.

Работа поддержана Грантом Президента РФ № МК-6706.2018.7, РФФ 15-15-20026.

3D-ЭКСПЛАНТНАЯ КУЛЬТУРА СПИНАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ МЫШИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕЙРОТРОФИНОВ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Екатерина Владимировна Семина¹, Полина Сергеевна Климович¹, Ксения Андреевна Рубина², Всеволод Арсеньевич Ткачук¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

lex2050@mail.ru

Нейротрофины играют ключевую роль в развитии, дифференцировке, выживаемости нейронов и регенерации нервов. В настоящем исследовании, используя 3D модель эксплантной культуры спинальных ганглиев (СГ) мышей GFP-nestin в Матригеле, мы сравнили влияние нейротрофинов NGF, BDNF и GDNF на рост аксонов и миграцию GFP-nestin клеток из СГ. Мыши GFP-nestin, у которых нейральные предшественники экспрессируют nestin и зеленый флуоресцентный белок GFP под одним промотером, были любезно предоставлены нам Г. Ениколоповым (Grigori N. Enikolopov, Renaissance School of Medicine, Stony Brook University, NY). Разработанный нами метод является удобной моделью для оценки влияния растворимых факторов и терапевтических агентов на рост и регенерацию нервов в R&D исследованиях. Анализируя экспланты в течение 21 дня, можно оценить скорость роста и миграцию клеток из эксплантов в Матригель. Спинальные ганглии GFP-nestin мышей высаживали в каплю Матригеля, в который дополнительно добавляли нейротрофины,

и культивировали 14 дней. Используя иммунофлуоресцентное окрашивание эксплантов (whole 3D mount assay) и конфокальную микроскопию (Leica SP) для трехмерной визуализации, оценивали количество аксонов и число мигрировавших GFP-nestin клеток. Аксоны красили антителами к NF200, ядра клеток докрасивали DAPI.

Было обнаружено, что GDNF достоверно стимулирует рост аксонов (в 2 раза, $p < 0,05$) из СГ, но не BDNF и NGF, по сравнению с контролем. Известно, что регенерация аксонов стимулируется также за счёт активных глиальных клеток, которые выполняют трофическую функцию для регенерирующих нервов, поэтому далее мы анализировали число GFP-nestin клеток, мигрировавших из СГ в Матригель. Обнаружено, что NGF и GDNF, но не BDNF, значительно стимулируют миграцию GFP-nestin клеток по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Результаты позволяют сделать вывод о том, что наибольшей способностью стимулировать регенерацию аксонов обладает GDNF, так как именно он стимулирует не только рост аксонов, но и миграцию глиальных клеток. Эффект NGF хоть и выражен в стимуляции миграции глиальных клеток, тем не менее, оказывается недостаточным на регенерации аксонов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ (проект № 19-75-30007).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В НАПРАВЛЕННОМ РОСТЕ АКСОНОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ВЫЖИВАЕМОСТИ НЕЙРОНОВ И РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВОВ

Екатерина Владимировна Семина¹, Ксения Андреевна Рубина², Карина Дмитриевна Рысенкова¹, Полина Сергеевна Климович¹, Максим Николаевич Карагаур³, Всеволод Арсеньевич Ткачук¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-semina@yandex.ru

Полноценная регенерация повреждённых органов и тканей зависит не только от скорости восстановления сосудистой сети, но и от своевременной реиннервации. Урокиназная система, в которую входит протеаза урокиназа uPA и ее рецептор, uPAR, стимулирует ангиогенез, восстанавливая кровоток в ишемизированной области. Активная урокиназа запускает внеклеточный протеолиз и деградацию матрикса, облегчая, таким образом, направленную миграцию сосудистых и гладкомышечных клеток, а также активирует проангиогенные факторы роста и цитокины, задепонированные в матриксе, которые способствуют привлечению стволовых клеток и клеток-предшественников сосудов. Кроме того, связываясь на поверхности клеток со своим рецептором uPAR, урокиназа стимулирует внутриклеточную сигнализацию, ответственную за пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток. Все эти процессы в целом способствуют своевременному восстановлению утраченного кровотока в области травмы. Однако восстановление сосудов в повреждённой ткани

не является единственным условием для её регенерации, и для полноты этого процесса также необходимо восстановление иннервации повреждённого участка.

Недавно нами и другими авторами было показано, что экспрессия и активность урокиназы и её рецептора является важным условием для роста и регенерации нервов, и одновременно с классическими нейротрофными факторами и навигационными молекулами, эти белки стимулируют восстановление поврежденных нервов в области травмы. Мы показали, что введение гена uPA в область травмы стимулирует рост аксонов и способствует сохранению нервного волокна, а отсутствие гена uPAR нарушает траекторию роста аксонов и существенно препятствует регенерации нерва. Более того, блокирование uPAR нарушает нормальную траекторию роста аксонов и стимулирует их ветвление. Эти данные о роли рецептора урокиназы в регуляции траектории роста нервов впервые свидетельствуют о возможных навигационных свойствах урокиназной системы.

Активность и экспрессия урокиназной системы при восстановлении сосудов и нервов на сегодняшний день рассматривается как одно из главных звеньев при репарации органов и тканей. Развитие регенеративной медицины и трансплантологии делает актуальными исследования урокиназы и её рецептора в качестве новых подходов для стимуляции эндогенной регенерации органов и тканей, а также в качестве потенциальных терапевтических мишеней при лечении ишемических и неврологических расстройств.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 17-04-00386).

МСК СПОСОБСТВУЮТ ПРОФИБРОТИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЯМ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЛПМД

Олеся Олеговна Сербина^{1,2}, Екатерина Владимировна Киселева², Егор Сергеевич Васецкий^{2,3}

¹ *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;*

² *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;*

³ *Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France*

olatyeva94@gmail.com

Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (ЛЛПМД) является аутосомно-доминантным заболеванием, характеризующимся прогрессирующим ослаблением мышц и замещением мышечной ткани соединительной и жировой тканью (фиброзом). Основная форма ЛЛПМД ассоциирована с aberrантной экспрессией гена *DUX4*, обусловленной делецией в массиве повторов *D4Z4* на хромосоме 4q35. Ранее мы показали, что МСК активно мигрировали в направлении миобластов со сверхэкспрессией *DUX4* по сравнению с контрольной группой. Мы предполагаем, что в очаге поражения МСК могут мешать регенерации мышечной ткани и способствовать фибротическим изменениям.

В данной работе исследовали взаимодействие миобластов и МСК в *in vitro* модели ЛЛПМД.

Использовали культуры МСК жировой ткани, первичных (ПМ) и иммортализованных (ИМ) миобластов от здоровых и больных ЛЛПМД доноров (Институт митологии, Париж).

Мы показали, что факторы миобластов от пациентов с ЛЛПМД индуцируют миграцию МСК, по-видимому через *CXCL12-CXCR4* ось и стимулируют их пролиферацию. Так же миобласты от больных ЛЛПМД доноров стимулируют образование фиброзных узелков в культуре МСК. В условиях воспаления ЛЛПМД-миобласты стимулируют увеличение уровня синтеза и секреции коллагена МСК (в 1,3 и 2,1 раза соответственно).

МСК препятствуют дифференцировке миобластов, оказывая наибольшее влияние на ЛЛПМД миобласты в условиях прямого сокультивирования. Иммуноферментным методом показано, что секретируемые МСК факторы увеличивают уровень синтеза и секреции VEGF в ИМ от здоровых доноров (в 5 и 14 раз соответственно) и не влияют на эти показатели в ИМ от больных доноров.

Таким образом, под влиянием миобластов МСК, мигрировавшие в очаг повреждения, пролиферируют и увеличивают продукцию коллагена. Кроме того, МСК ингибируют миогенную дифференцировку и влияют на экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом. Такое взаимное влияние, вероятно, может быть одной из причин фиброза.

Работа проводится в рамках темы Государственного задания ИБР РАН и Программы президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»

ДОЗАЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ И МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА КРЫС

Валерий Георгиевич Сергеев, Виктор Михайлович Чучков, Татьяна Николаевна Сергеева

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

cellbio@ya.ru

Факторы секретируемые в ходе нейровоспаления (цитокины, хемокины, трофические факторы, свободно-радикальные производные) оказывают существенное влияние на пролиферацию, выживание, дифференцировку и миграцию нейральных стволовых клеток (НСК). Ключевую роль в механизмах нейровоспаления играют микро- и астроглиальные клетки, которые, в зависимости от степени своей активации, могут секретировать противо- или провоспалительные факторы, оказывающие, как мы предполагаем, противоположный эффект на судьбу НСК. Для проверки этой гипотезы нами проведено исследование эффектов внутрижелудочкового введения разных доз бактериального липополисахарида (ЛПС) на экспрессию в латеральной субвентрикулярной зоне маркеров пролиферации и дифференцировки НСК (нестина, нейрон-специфической енолазы). Эксперимент проводили на 15 самцах линии Вистар, весом 280–320 г., содержащихся в стандартных условиях. Крысам экспериментальных групп при помощи стереотаксической установки вводили в правый латеральный желудочек 10 мкл физиологического раствора, содержащего ЛПС (*Escherichia coli*) в концентрациях 0,001 мкг/мл («малая доза») и 0,1 мкг/мл («большая доза»). Животным контрольной группы вводили аналогичный объем стерильного физиологического раствора. Через 5 дней животных декапитировали, мозг фиксировали в 4% растворе

параформа и замораживали на сухом льду. Криостатные срезы окрашивали иммуногистохимическим методом с использованием антител к нестину, нейрон-специфической енолазе, нейротрофному фактору мозгового происхождения BDNF, глиальному кисломому фибриллярному белку GFAP и CD-11 β . Обнаружено дозозависимое усиление экспрессии в области черной субстанции GFAP и увеличение количества CD-11 β иммунопозитивных клеток, интенсификация синтеза астроглиальными клетками BDNF после введения малой дозы ЛПС и приобретение микроглиальными клетками провоспалительного фенотипа под действием большой дозы эндотоксина. Кроме того, внутривенное введение малой дозы ЛПС увеличивало количество клеток, экспрессирующих нестин и нейрон-специфической енолазу, тогда как большая дозировка приводила к обратному эффекту. Полученные результаты позволяют предположить, что синтезируемые глиальными клетками в условиях низкой интенсивности воспалительного ответа факторы оказывают стимулирующее действие на пролиферацию и дифференцировку НСК, тогда как интенсивное нейровоспаление ингибирует эти процессы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-015-00177а.

НА ЭТАПАХ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ КОНСТРУКТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Наталья Сергеевна Сергеева¹, Валентина Александровна Кирсанова¹, Юсеф Джорджевич Хесуани², Павел Анатольевич Каралкин¹, Ирина Константиновна Свиридова¹

¹ *Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия;*

² *ЧУ «ЗД-Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия*

prognoz.06@mail.ru

Актуальность создания функционально активных конструкций щитовидной железы обусловлена неадекватностью заместительной гормонотерапии у пациентов, перенесших тиреоидэктомию по поводу доброкачественных или злокачественных новообразований. Терапевтические гормоны обеспечивают медленный подъем их концентрации в кровеносном русле с последующим монотонным убыванием без учета реальных потребностей организма.

Целью работы являлась разработка методик выделения, культивирования и масштабирования тиреоцитов (ТЦ), тиреоидных фолликулов (ТФ) и микроорганных (МО) культур ЩЖ человека как этапа создания тканеинженерных конструкций (ТИК). Объектами исследования служили фрагменты нормальной ЩЖ, полученные после тиреоидэктомии по поводу рака (n=31). ТЦ, ТФ и МО получали механической дезагрегацией ткани ЩЖ с последующим фильтрованием через серию сит. ТЦ, ТФ и МО культивировали (до 4,5 мес.) на полупроницаемых мембранах на границе раздела сред — поверхности гидрогеля на основе лизата тромбоцитов (ЛТ) человека и воздуха. В отдельной серии экспериментов МО культивировали на мембране в жидкой ростовой среде, обогащенной ЛТ. На этапах экспериментов в культурах оценивали долю жизнеспособных клеток (окраска Dil, МТТ), пролиферирующих клеток (экспрессия Ki67), способность захватывать йод (экспрессия NIS) и синтезировать

тиреоглобулин, а также долю стволовых предшественников ТЦ (экспрессия Oct3/4). Также на этапах экспериментов осуществляли прижизненную морфометрию.

Было установлено, что при 3D-культивировании одиночных ТЦ происходит быстрая (за 7 дней) селекция минорной (<5%) популяции Oct3/4⁺ клеток, формирующих «гнезда» из нескольких клеток, а далее — ТФ (в стенке которых выявляются Ki67⁺ клетки) с эпителиальной полярностью ТЦ и способностью синтезировать ТГ. При 3D-культивировании ТФ до 2-х месяцев происходит увеличение их размеров (на 13,9 \pm 1,3%), при этом ТФ сближаются и ассоциируют. В их стенке выявляются Ki67⁺ клетки. ТЦ в ТФ через 4,5 мес. сохраняют способность синтезировать ТГ.

При 3D-культивировании МО ЩЖ в течение 21 дня в них сохраняется фолликулярная структура, ТЦ в ТФ способны захватывать йод и синтезировать ТГ (NIS⁺, ТГ⁺). В ТФ визуализируются единичные Ki67⁺ клетки. Вокруг МО развивается соединительная ткань, объединяющая МО в единую структуру. По ее периферии выявляются единичные фибробластоподобные Ki67⁺ клетки.

Таким образом, нами была разработана система для 3D-культивирования структур ЩЖ человека разного уровня организации (ТЦ, ТФ, МО) как основа для создания ТИК.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ РНК ХЕЛИКАЗЫ DDX3 IN VITRO И IN VIVO

Ольга Владимировна Сергеева¹, Рената Салаватовна Ялчина¹, Татьяна Олеговна Абакумова¹, Татьяна Александровна Приказчикова¹, Илья Игоревич Курочкин¹, Тимофей Сергеевич Зацепин^{1,2}

¹ *Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия;*

² *МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

o.sergeeva@skoltech.ru

Белок DDX3 относится к семейству АТФ-зависимых РНК-хеликаз DEAD бокса, имеющих консервативный мотив Asp-Glu-Ala-Asp, которые были обнаружены у многих организмов — от дрожжей до человека. DDX3 является многофункциональным белком, участвующим в различных стадиях метаболизма РНК: транскрипции, сплайсинге, трансляции, транспорте и деградации [Y. Ariumi et al., 2014]. DDX3 является терапевтической мишенью в онкологии, разработана малая молекула-ингибитор хеликазной активности [M. Heerma van Voss et al., 2015]. С помощью подхода РНК-интерференции экспрессия хеликазы была снижена и были подобраны условия эффективного ингибирования в клеточной линии Нера1-6 (80 \pm 3% на уровне мРНК и 97 \pm 3% на уровне белка) и печени мыши. Для работы in vivo были выбраны две временные точки — 6 дней с эффективностью ингибирования мРНК DDX3 — 85 \pm 3%, белка — 63 \pm 4% и 13 дней с эффективностью ингибирования мРНК DDX3 — 70 \pm 16%, белка — 95 \pm 2%. В результате анализа данных высокопроизводительного РНК-секвенирования клеток были обнаружены изменения в экспрессии 107 генов, тогда как для печени были найдены изменения экспрессии 66 генов на 6 день ингибирования хеликазы DDX3 и 155 генов на 13 день ингибирования. Можно выделить, как общие для клеток и ткани изменения в биологических путях, таких как снижение метаболизма жирных кислот, ксенобиотиков, так и отличающиеся процессы.

В случае более короткой временной точки ингибирования DDX3 *in vivo* наблюдаемые изменения имеют больше корреляций с данными, полученными для клеточной линии, тогда как после 13 дней ингибирования появляются признаки воспалительного процесса и меняется профиль биологических процессов в печени.

Финансирование исследования: РФФ 19-74-00119.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК MALAT1, СВЯЗАННОЙ С НЕЙРОГЕНЕЗОМ, В ПЯТИ ОТДЕЛАХ МОЗГА МЫШЕЙ В МОДЕЛИ СТРЕССА ВЫЯВИЛА ЗНАЧИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИПОТАЛАМУСЕ

**Иван Алексеевич Сидоренко,
Владимир Николаевич Бабенко**

Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

vanyasidorenko22@gmail.com

Большое количество длинных некодирующих РНК (lncRNA) экспрессируются в нейрогенезе и в ряде злокачественных опухолей. Мы исследовали одну из наиболее известных lncRNA *Malat1* по данным полнотранскриптомного анализа в мозге мыши, используя модель стресса. Данная lncRNA служит индикатором и медиатором масштабного изменения профиля экспрессии генома, участвуя (влияя) в таких процессах, как транскрипция, сплайсинг и ремоделинг хроматина. На основе анализа профилей экспрессии *Malat1* и ряда ее аннотированных партнеров в пяти областях мозга (гиппокамп, гипоталамус, стриатум, ВТА, МРН) мы выяснили, что данные lncRNA наиболее интенсивно экспрессируются в стриатуме, что подчеркивает его интенсивный энергетический метаболизм по сравнению с другими отделами. Другое примечательное наблюдение состоит в том, что в гипоталамусе существенно снижается экспрессия основных генов комплекса у стрессированных мышей по сравнению с контролем. На основе проведенного анализа можно считать, что уменьшение экспрессии гена нейрогенеза *Malat1* в связи со стрессом может воздействовать, как показано в публикациях, на иммунную систему, меняя экспрессионную активность множества генов по сравнению с контролем, что приводит к злокачественным образованиям.

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ ПРОГРАММЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

**Любовь Сергеевна Сидорович,
Наталья Аркадьевна Михайлова,
Михаил Георгиевич Хотин**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Isidorovich96@gmail.com

Ключевой задачей системы GMP (good manufacture practice) при производстве биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) является обеспечение качества, а значит и безопасности конечного продукта. При производстве БМКП используют асептические технологии, чистые помещения и стерильные материалы, а также регулярно производят мониторинг микробиологической чистоты производства. Микробиологический мониторинг производственной среды осуществляется с целью гарантии стабильности асептических условий производства, выявления начальных отклонений и выработке корректирующих действий

до возникновения ситуаций, приводящих к появлению нестерильной продукции. При введении программы микробиологического мониторинга окружающей среды ключевыми задачами являются: выбор методов и приборов для проведения исследований, выбор точек отбора проб с последующим составлением планов отбора проб, установление уровней тревоги и действия. Группой контроля качества опытного производства биомедицинских клеточных продуктов ИИЦ РАН внедрена программа микробиологического мониторинга производственной среды на основании санитарных правил, «Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами», методических рекомендаций МУ 44-11 Б «Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов», утвержденных МЗ России 19.05.97 г., а также рекомендаций «World Health Organization». Для выявления микроорганизмов были выбраны следующие методы.

Ударное действие воздушной струи для определения количества микроорганизмов в воздухе.

Седиментационная чашка для определения микроорганизмов в воздухе во время проведения асептических процессов.

Контактная чашка/отпечаток пальцев для выявления микроорганизмов на поверхностях рабочих зон, оборудования, одежды.

Смывы ватными тампонами для взятия образцов с ограниченных поверхностей.

Точками отбора проб были выбраны: место попадания сырья в чистую зону; место работы оператора с продуктом; места контакта сырья и поверхностей; места схождения воздушных потоков. Утвержден календарный план отбора проб в соответствии с нуждами производственной среды и установлены критические значения количества микроорганизмов в окружающей среде (уровни действия и тревоги).

В результате внедрения программы микробиологического мониторинга были обеспечены асептические производственные условия, снижена общая биологическая нагрузка контролируемой среды, утверждены корректирующие действия, направленные на избежание последующей контаминации производственной среды.

ВЛИЯНИЕ МСК И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МСК, НА КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ

Денис Николаевич Силачев^{1,2}, Кирилл Владимирович Горюнов¹, Маргарита Александровна Шпилюк¹, Ольга Сергеевна Безнощенко¹, Наталья Яковлена Морозова¹, Елизавета Евгеньевна Краевая¹, Василий Андреевич Попков^{1,2}, Ирина Борисовна Певзнер^{1,2}, Любава Дмитриевна Зорова^{1,2}, Екатерина Алексеевна Евтушенко², Наталья Леонидовна Стародубцева¹, Алексей Сергеевич Кононихин¹, Анна Евгеньевна Бугрова¹, Евгений Геннадиевич Евтушенко², Егор Юрьевич Плотников^{1,2}, Дмитрий Борисович Зоров^{1,2}, Геннадий Тихонович Сухих¹

¹ ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

d_silachev@oparina4.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) используются в качестве мощного терапевтического инструмента для лечения ряда патологий,

включая иммунные патологии. Однако в литературе имелись сообщения о нежелательном влиянии МСК на свертываемость крови, что побудило нас исследовать прокоагулянтные свойства МСК человека, выделенные из послеродовой пуповины. Мы выявили сильные прокоагулянтные эффекты МСК на кровь человека и плазму, свободную от тромбоцитов, с использованием ротационной тромбоэластометрии и тромбодинамических тестов. Подобное потенцирование свертывания было продемонстрировано для внеклеточных везикул (ВВ), полученных из кондиционированной среды от МСК. Чтобы предложить подходы, позволяющие избежать нежелательных эффектов в клинике, мы изучили влияние гепарина на прокоагуляционные свойства МСК. Исследования *in vitro* показали, что МСК сохраняли прокоагулянтную активность в отношении крови у детей, получающих терапевтическую дозу нефракционированного гепарина. Анализ механизмов, ответственных за прокоагулянтный эффект МСК/ВВ, выявил присутствие тканевого фактора и других белков, участвующих в связанных с коагуляцией путях. Кроме того, мы обнаружили, что некоторые МСК и ВВ были положительными на аннексин V, что подразумевает присутствие фосфатидилсерина на их поверхностях, который может запускать прокоагулянтные пути. Таким образом, мы выявили прокоагулянтную активность МСК/ВВ, связанную с присутствием фосфатидилсерина и тканевого фактора. В этой связи необходимо дальнейшее детальное изучение молекулярных механизмов опосредованной МСК коагуляции для предотвращения нежелательных побочных эффектов терапии МСК.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ КОЛЛАГЕН-ЛАМИНИНОВЫХ МАТРИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИГУАНИДИН, ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ РАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ

Татьяна Юрьевна Синицына¹, Марина Николаевна Парасковой¹, Арюна Пурбодоржиевна Цыбденова², Юрий Содномович Балханов², Олег Сергеевич Очиров³, Эрдэм Баирович Дашинимаев⁴

¹ ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова», Улан-Удэ, Россия;

² МИП «Байкальский центр биотехнологий», Улан-Удэ, Россия;

³ Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия;

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

sint96@inbox.ru

Актуальность. Раневые инфекции, несмотря на большое количество разработок и применения новых материалов в лечении повреждений мягких тканей, остаются довольно распространёнными осложнениями ранозаживления. Одним из перспективных подходов к улучшению результатов лечения ран является создание средств, ускоряющих эпителизацию дефекта, при этом обладающих антисептической активностью и свойствами биосовместимости.

Целью нашей работы являлось: оценить эффективность децеллюляризованных коллаген-ламининовых матриц, содержащих гидрогель на основе полигуанидина, при репарации моделированных лоскутных ран крыс.

Материалы и методы. При сочетании методик экстрагирования коллагена из сухожилий хвостов крыс, получения коллагеновых подложек, культивирования кератиноцитов линии HaCaT на коллагеновой матрице с последующим децеллюлированием создан композитный материал, содержащий коллаген I типа и ламинин. Для модификации полученной тканеинженерной конструкции предлагается гидрогель основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, полученный путём сшивания концевых аминогрупп полимера формальдегидом.

Исследования по ранозаживлению выполнены на крысах-самцах линии Wistar. На модели раневого дефекта, полученные путем иссечения кожно-фасциального лоскута с предотвращением раневой контракции с помощью фиксации края раны шовным материалом, накладывали аппликации полимерного композитного материала и закрывали перевязочным материалом.

Результаты. С помощью гистологических методов через 21 день на участках повреждения отмечены сформированные эпителиальные пласты, на уровне дермы молодые незрелые коллагеновые волокна, расположенные упорядоченно, плотно, преимущественно параллельными рядами. Полученные патоморфологические данные по восстановлению целостности кожного покрова позволяют рассматривать коллаген-ламининовый матрикс в сочетании с полигуанидином перспективным ранозаживляющим материалом.

Выводы.

1. Получен модифицированный биodeградируемый композитный материал, обладающий выраженным стимулирующим влиянием на заживление ран и антисептическими свойствами.

2. Показано восстановление целостности кожного покрова и снижение воспалительного процесса в ране, благодаря применению созданной репаративной тканеинженерной композиции на основе децеллюляризованной коллаген-ламининовой подложки, модифицированной полигуанидином.

Исследования выполнены при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «У.М.Н.И.К.».

СПОСОБ СОЗДАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТЕОПОРОЗА

Сергей Владимирович Сирак, Евгений Вячеславович Щетинин, Николай Николаевич Диденко, Алла Григорьевна Сирак, Мария Олеговна Диденко

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия;

dr.maria.didenko@gmail.com

Создание модели остеопороза в эксперименте на крупных животных продиктовано необходимостью прогнозирования течения и возможных исходов различных патологических состояний организма на фоне сопутствующего остеопороза.

Цель исследования: разработать способ создания экспериментальной модели остеопороза, позволяющей исключить летальность подопытных субъектов, получив при этом полноценную и необратимую модель остеопороза с большим объемом тканей, доступных для исследования.

Материалы и методы. Исследование проведено на 10 трехлетних овцах Северо-Кавказской породы.

В основной группе (6 животных) под общим наркозом (Zoletil 50) выполняли двухстороннюю овариоэктомию,

затем начиная со второго дня после операции в течение 3 месяцев проводили внутримышечные инъекции декса-метазона по 12 мг на 1 кг массы животного по 6 инъекций в неделю.

В контрольной группе (4 животных) под общим наркозом (Zoletil 50) выполняли одностороннюю овариоэктомию, затем через 3 дня производили инъекции гидрокортизона: 1, 14 день 0,1 мл (мг); 2, 3, 12, 13 дни — 0,2 мл (мг); 4–11 дни 0,3 мл (мг).

Экспериментальную модель считали окончательно сформированной при плотности костной ткани нижней челюсти ниже 750 ЕД по шкале Хаунсфилда.

Результаты и обсуждение. В основной группе через 3 месяца плотность костной ткани челюстных костей по шкале Хаунсфилда составила 725 ЕД, а в контрольной группе плотность костной ткани челюстных костей по шкале Хаунсфилда составила 925 ЕД.

Проведена серия опытов с целью изучения возможности активизации репаративного остеогенеза челюстных костей овец в искусственно созданном дефекте при использовании остеопластических материалов на основе аллогенной кости, пористого титана и β -трикальцийфосфата. При этом в группе овец ($n=12$) предварительно сформирован экспериментальный остеопороз по разработанному способу. На предварительной фазе эксперимента удалось добиться значимого снижения минеральной плотности костной ткани у всех животных (ниже 750 ЕД по шкале Хаунсфилда). В результате эксперимента летальных исходов в послеоперационном периоде на фоне терапии глюкокортикоидом не отмечено, все животные могут быть использованы в исследованиях повторно.

Заключение. В результате проведенного исследования получена экспериментальная модель остеопороза, наиболее пригодная для исследований в области оперативной хирургии, клеточных технологий, челюстно-лицевой хирургии, травматологии, стоматологии, а также для изучения особенностей действия фармакологических препаратов в условиях остеопороза.

3D БИОЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ НА ОСНОВЕ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ И ЖИВЫХ КЛЕТОК

Дарья Александровна Сичкар^{1,2}, Александра Дугаровна Балданшириева¹, Юлия Владимировна Бабушкина¹, Олег Германович Макеев¹⁻³

¹ Отдел молекулярных и клеточных технологий, ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

² Лаборатория технологий клеточной и генной терапии, ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия;

³ Инновационный центр химико-фармацевтических технологий, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

sichkar2017@yandex.ru

Одной из важнейших проблем регенеративной медицины является разработка терапии тяжелых повреждений кожи с осложненным рельефом раневой поверхности. Для восполнения утраченной ткани могут быть использованы 2D-эквиваленты кожи, представленные на мировом рынке. Данные эквиваленты имеют вид плоскостной повязки, что не позволяет заполнить раневой дефект полностью.

Для эффективной заместительной терапии тяжелых повреждений кожи был разработан 3D-эквивалент на основе биоразлагаемого скаффолда с покрытием из среднемолекулярных пептидов и живых клеток, имеющий форму геля, что позволяет заполнить раневой дефект любой сложности.

Для создания кожного эквивалента использовали культуры ММСК и фибробластов, выделенных у пациентов, после подписания ими добровольного информированного согласия.

ММСК выделяли ферментативным способом из жировой ткани, полученной в результате липоаспирации в области нижней горизонтальной складки передней брюшной стенки. Выделение клеточной культуры фибробластов осуществлялось из кожного лоскута. Все культуры, задействованные в эксперименте, прошли испытания по исследованию генетической и инфекционной безопасности. Клеточные культуры инкубировали в стандартных условиях.

При достижении необходимой клеточной массы (в зависимости от площади поражения), после контроля на контаминацию и стабильность генома клетки осаждали на биоразлагаемый скаффолд (микросферы, диаметр 150–200 мкм). Скаффолд имеет в своем составе уникальный полимерный центр и покрытие из оригинальных среднемолекулярных пептидов.

Разрабатываемый 3D-эквивалент кожи был испытан на 10 пациентах с нейротрофическими язвами нижних конечностей. По результатам проведенных испытаний, биоэквивалент обеспечивает уменьшение площади кожного дефекта от 80 до 100% в среднем в течение 5–6 недель у 95% пациентов. Двухгодичное наблюдение пациентов после терапии продемонстрировало устойчивость достигаемого эффекта — только у двух пациентов было зарегистрировано повторное язвообразование на соседних от ранее репарированных участках кожи. Полученные результаты демонстрируют наибольшую эффективность по сравнению с 2D-эквивалентом Apligraf (Organogenesis, США), эффективность которого по данным FDA составляет от 56 до 80% к 12 неделе терапии.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ДЛЯ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МОДЕЛЯХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕЙ

Елена Вячеславовна Скворцова¹, Сергей Анатольевич Синенко¹, Валерий Всеволодович Зенин², Алексей Николаевич Томилин¹

¹ Лаборатория Молекулярной биологии стволовых клеток, Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Отдел внутриклеточной сигнализации и транспорта, Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e.skvortsova@incras.ru

Трансплантация органов и тканей является широко востребованным методом лечения различных заболеваний человека. Главным условием успешной пересадки тканей является индукция у реципиента иммунологической толерантности к аллогенным тканям донора. Ключевым звеном иммунной системы, обеспечивающим иммунологическую толерантность, являются регуляторные дендритные клетки (Regulatory dendritic cells — DCregs). В отличие от зрелых дендритных клеток, иницирующих иммунный ответ, DCreg клетки через

активацию регуляторных Т-клеток подавляют Т-клеточный ответ на антигены трансплантата. Данные клетки имеют большую значимость в трансплантологии, а также в разрабатываемой технологии тканезаместительной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). Однако, на современном этапе использование DСreg затруднено, в связи с сложной технологией их получения и поддержания. Целью данного исследования была отработка и стандартизация метода получения DСreg из индуцированных ПСК мыши.

Нами была использована трехстадийная методика по получению обогащенной популяции DСreg клеток из иПСК мыши (Cai et al., 2017, Zhang et al., 2014). иПСК, полученные из фибробластов линии C57BL/6J, культивировали на фидерной подложке из клеток OP-9, через 7 дней добавляли колониестимулирующий фактор (GM-CSF), и на последней стадии дополнительно — интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий ростовой фактор (TGF- β). Общее время дифференцировки иПСК в незрелые DСreg клетки составляло 14 дней. Помимо морфологических особенностей, DСreg клетки обладают характерным профилем экспрессии клеточных маркеров. Популяции клеток, полученные на каждой стадии дифференцировки, анализировали с помощью проточной цитометрии, на наличие экспрессии специфических маркеров: CD34, CD45R, CD80, CD86 CD11c,b. Цитометрический анализ показал, что полученная популяция клеток соответствует профилю экспрессии клеточных маркеров характерных для DСreg клеток. Так, количество клеток, позитивных на CD80 и CD86 уменьшается, а позитивных на CD45R и CD11c увеличивается, по мере дифференцировки.

Отработанная методика позволяет получить достаточное количество DСreg клеток (линии C57BL/6J) для первичного анализа индукции иммунологической толерантности данными клеткам аллогенной линии мышей линий BALB/C, оцениваемая их способностью долговременного приживления трансплантатов кожи, а также иПСК, пересаженных от донорской линии C57BL/6J.

Работа поддержана грантом президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (ФИМТ).

СОЗДАНИЕ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА

Виктория Валерьевна Скопенкова^{1,2}, Вадим Евгеньевич Жерновков³, Анна Вячеславовна Старикова^{1,2}, Татьяна Владимировна Егорова^{1,2}

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

² ООО Марлин Биотех, Москва, Россия;

³ Systems Biology Ireland, UCD, Dublin, Ireland

silina.viktoria@inbox.ru

Генная терапия на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) — наиболее перспективный подход лечения мидодистрофии Дюшенна. Одним из основных недостатков AAV является его малая емкость (4,7 кБ), большую часть которой занимает микроген дистрофина (3,5 кБ). При этом необходимо обеспечить высокий уровень экспрессии белка строго в мышцах, чтобы избежать иммунного ответа. Целью нашей работы было создание высокоэффективного мышечно-специфического синтетического промотора размером не более 0,5 кБ.

Для тестирования новых промоторов был сконструирован вектор для сборки AAV-eGFP, в 5'UTR области которого расположен сайт для клонирования синтетического

промотора перед последовательностью минимального CMV-промотора. В 3'UTR расположен сайт рестрикции для вставки баркода. Для оценки множественности инфекции в векторе также закодирован *FusionRed* под конститутивным CMV промотором. После клонирования в вектор промоторных последовательностей и последующего отбора наиболее эффективных кандидатов, с полученными конструкциями будут собраны AAV9-eGFP вирусы для внутривенных инъекций мышам и сравнительного анализа экспрессии eGFP с разных промоторов.

В ходе работы были проанализированы данные РНК-секвенирования с целью выявить гены, экспрессирующиеся исключительно в мышечной ткани. Затем в их промоторных областях были определены повторяющиеся мотивы — TFBS. Было синтезировано 20 выродженных мотивов, среди которых 10 ранее неизвестных TFBS и 10 уже известных по литературным данным. Несколько копий индивидуальных TFBS лигировали и клонировали перед minCMV. С данными векторами собирали AAV-Dj-eGFP вирусы, которыми инфицировали культуру мышечных клеток MB135. По результатам экспериментов выявили группы мотивов, которые обеспечивали высокий, средний и минимальный уровень экспрессии *Gfp*. В дальнейший анализ брали мотивы с высокой и средней эффективностью. Такие выродженные TFBS случайно лигировали друг с другом и клонировали в вектор для создания библиотеки промоторов. С полученной библиотекой будут собраны AAV-Dj-eGFP вирусы для инфекции MB135. На клеточном сортере, основываясь на данных экспрессии *FusionRed*, будет отобран пул клеток, в которые попала единичная копия вируса, и отсортированы клетки с максимальным уровнем экспрессии *Gfp*. Далее, отобранные промоторы будут переклонированы в векторы с баркодом, где каждому промотору будет соответствовать индивидуальный баркод. Полученный синтетический промотор с заданными свойствами должен обеспечить высокую тканеспецифичную экспрессию трансгена.

СИСТЕМНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННО-ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ (ASIA A/B): I/IIA СТАДИИ РАНДОМИЗИРОВАННОГО НЕОСЛЕПЕННОГО ПРОСПЕКТИВНО-РЕТРОСПЕКТИВНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ

Владимир Александрович Смирнов¹, Андрей Анатольевич Гринь¹, Сергей Иванович Рябов², Марина Александровна Звягинцева², Владимир Николаевич Смирнов²

¹ НИИ Скорой Помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия;

² НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

vla_smirnov@mail.ru

Травма спинного мозга — тяжелое повреждение ЦНС, приводящее к глубокой инвалидизации пострадавших и снижению качества жизни. На сегодняшний день эффективные патогенетические методы лечения повреждений спинного мозга пока недоступны. Ранее в серии доклинических исследований на животных моделях мы показали высокую эффективность системной клеточной терапии, обеспечивающей регресс двигательных

нарушений до 53%, а также уменьшение объема очага миелопатии по данным высокопольной МРТ.

Проведены I и IIa стадии рандомизированного неослепленного проретроспективного клинического исследования безопасности и эффективности клеточной терапии у пострадавших с ушибом спинного мозга тяжелой степени (ASIA A/B). 20 пациентов были разделены на 2 группы. 10 пациентам проведено 4 внутривенных введения концентрата аллогенных мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (в среднем, по 300×10^6 клеток за 1 введение), начиная с 1–3 суток после травмы с интервалом в 1 неделю. Период наблюдения составил 1 год.

Безопасность клеточной терапии оценивали с помощью классификации СТСАЕ v5.0. Всего у 10 пациентов, получавших клеточную терапию, за 1 год выявили 392 нежелательных явления. Из них 2 осложнения отнесены к группе «вероятно связанным с терапией», оба были незначительными (повышение температуры тела менее 2°C). Других нежелательных явлений, связанных с клеточной терапией, выявлено не было. Анализ эффективности терапии подтвердил достоверное восстановление проводниковой функции спинного мозга и улучшение исходов по сравнению с контрольной группой (стандартная терапия). Средний прирост по шкале ASIA в экспериментальной группе составил 2,2 балла, в контрольной группе он не превышал 0,9 баллов. Суммарный двигательный индекс по верхним (UEMS) и нижним (LEMS) конечностям в обеих группах составил 77 ± 19 и $33 \pm 21,6$ баллов, соответственно. 78% пациентов после клеточной терапии были способны к самостоятельной вертикализации и передвижению, в контрольной группе — 30%. Также отмечено достоверное снижение уровня спастичности в компрометированных конечностях (шкала Ашфорта) и восстановление функции тазовых органов (чувства наполнения мочевого пузыря и произвольного мочеиспускания). Уровень жизни пациентов, (шкала независимости, FIM scale) был достоверно выше в экспериментальной группе.

Системное применение аллогенных мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека является безопасным и эффективным методом клеточной терапии тяжелых ушибов спинного мозга.

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ ДИКАЛЬЦИЙФОСФАТА ДИГИДРАТА И ОКТАКАЛЬЦИЙФОСФАТА

Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Юрий Валерьевич Зобков, Владимир Сергеевич Комлев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

baldyriz@gmail.com

Имплантаты на основе фосфатов кальция (ФК) ввиду своего элементного сходства с неорганической составляющей кости, что дает возможность к созданию биорезорбируемых имплантатов являющиеся скаффолдами для формирования костной ткани de novo. Низкотемпературные модификации ФК, такие как дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД) и октакальцийфосфат (ОКФ), являются наиболее перспективными ФК, являясь прекурсором к образованию гидроксиапатита (ГА),

в условиях организма они обеспечивают высокую скорость формирования новой костной ткани при низком регенеративном потенциале окружающей среды.

Проблема создания материалов на основе ДКФД и ОКФ заключается в их нестабильности при повышении температуры выше 37°C , поэтому была создана методика основанная на химической трансформации исходных объемных керамических матриц на основе трикальцийфосфата (ТКФ) в условиях буферных систем. Процесс трансформации ТКФ в ДКФД и ОКФ имеет несколько стадий, описанные реакциями упрощенного вида:

1. $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 4\text{H}^+ \leftrightarrow 3\text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{PO}_4^-$
2. $\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$
4. $4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{Ca}^{2+} + 2\text{PO}_4^{3-} = \text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 3\text{H}_2\text{O}$

Природа процессов трансформации заключается в перекристаллизации исходного ФК с образованием промежуточных полярных комплексных соединений. Приложение направленных магнитных полей на общую систему в момент протекания перекристаллизационных процессов способно повлиять на конечную микроструктуру путем организации направления роста кристаллов, а так же изменить форму и размер кристаллов.

Проведенное исследование показало влияние магнитных полей на процесс образования низкотемпературных фосфатов кальция ДКФД и ОКФ. Была показана возможность использования магнитных полей для управления направлением роста кристаллов и регулирования размеров кристаллов на этапе формирования матрикса.

Работа выполнена при поддержке программы президенту 37П. Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 007-00129-18-00.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АНТИСМЫСЛОВОГО ТИОФОСФАТНОГО 5,8SRRNA-11-ФРАГМЕНТА НА РОСТ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА HEP-2

Светлана Николаевна Смирнова, Анна Александровна Жукова, Елизавета Сергеевна Агеева, Екатерина Владимировна Лайкова, Владимир Владимирович Оберемок

Крымский Федеральный Университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

biologkrim@mail.ru

Плоскоклеточный рак кожи (эпидермоидная карцинома) занимает одно из лидирующих мест по встречаемости среди новообразований кожи. По данным статистики, за последние десять лет показатели смертности в РФ от рака указанной локализации варьировались от 1,09 до 1,16 на 100 000. Наша исследовательская группа сосредоточилась на создании противораковой мазей на основе тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов для применения в межоперационный период и снижения уровня метастазирования. В качестве мишени для экспериментов с ДНК-лекарством, подавляющим активность клеток эпидермоидной карциномы, была выбрана 5,8S рРНК, играющая ключевую роль в биосинтезе белка. Был разработан антисмысловый фрагмент длиной 11 нт (5'-TGCGTTTGAAG-3', 5,8S rRNA-11-фрагмент), комплементарный участку 5,8S рРНК. В работе была использована клеточная линия HEP-2 эпидермоидной карциномы человека (ООО БиолоТ, Россия).

Оценка кинетики пролиферативной активности клеточной линии HEp-2 под воздействием 5.8SrRNA-11-фрагмента в концентрации 1000 нг и 2000 нг проводилась на приборе xCELLigence RTCA DP Analyzer (ACEA Biosciences, Inc., США). Клеточная линия HEp-2 была засеяна в лунки планшета прибора плотностью $6,0 \times 10^3$ кл./лунка. Определение клеточного индекса (КИ), как показателя интенсивности роста клеток, выполняли в режиме реального времени в течение 9 часов.

Через 4,5 часа наблюдений КИ в контрольной пробе составил $0,52 \pm 0,05$ у.е., что превысило показатели в опытных пробах на 38,46% ($0,32 \pm 0,03$ у.е., $p < 0,05$, $df=14$) в группе с концентрацией 1000 нг и на 46,15% ($0,28 \pm 0,02$ у.е., $p < 0,01$, $df=14$) в группе с концентрацией 2000 нг соответственно. Через 9 часов эксперимента КИ ($1,15 \pm 0,16$ у.е.) в контрольной пробе практически одинаково превышал показатели в экспериментальных пробах с 5.8SrRNA-11-фрагментом в концентрации 1000 нг ($0,59 \pm 0,07$ у.е., $p < 0,008$, $df=14$) и с 5.8SrRNA-11-фрагментом в концентрации 2000 нг ($0,59 \pm 0,05$ у.е., $p < 0,007$, $df=14$).

Таким образом, в ходе наших исследований было выявлено ингибирующее действие 5.8SrRNA-11-фрагмента на пролиферативную активность клеточной линии HEp-2.

ВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЛЕННОГО СУСТАВА ПРИ ПОМОЩИ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Иван Александрович Смышляев, Сергей Ильсуверович Гильфанов, Илья Игоревич Еремин, Андрей Алексеевич Пулин, Ильмира Ренатовна Гильмутдинова

ФГБУ ЦКБ с поликлиникой УДП РФ, Москва, Россия
smyshlyayev89@yandex.ru

За период с 2015 по 2018 на клинических базах, где проводилось исследование было пролечено 48 пациентов в соответствии с протоколом исследования. При классификации степени ОА использовалась классификация по рентгенологическим признакам Kellgren and Lawrence.

Результаты. Ни у одного больного не было выявлено нежелательных явлений или нежелательных реакций.

При проведении физикального осмотра отмечалась положительная динамика по следующим параметрам: степень отека в области коленного сустава, окружность бедра, боль при пальпации области коленного сустава, оцененная по ВАШ.

При проведении УЗИ коленного сустава отмечалось снижение объема избыточной внутрисуставной жидкости и уменьшение толщины синовиальной оболочки коленного сустава.

При проведении МРТ отмечалось увеличение толщины хрящевой ткани на нагружаемой поверхности мыщелков бедренной и большеберцовой костей, уменьшение площади хондральных дефектов, заполнение дефектов тканью по качеству МР-сигнала сопоставимой с хрящевой, уменьшение объема костной ткани, находящейся в состоянии трабекулярного отека.

При оценке данных опросных шкал отмечалось статистически-значимое улучшение функции коленного сустава по KSS и KOOS, начиная со 2 визита. Также отмечалось статистически-значимое качество жизни, оцененное по SF-36 после введения СВФ.

Выводы. Применение стромально-васкулярной фракция из жировой ткани приводит к восстановлению хондральных дефектов на нагружаемых поверхностях мыщелков бедренной и большеберцовой костей, и способствует покрытию поверхности дефекта тканью по качеству МР-сигнала сопоставимой с хрящевой у 100% пациентов с ОА 1 и 2 степени и у 50% пациентов с ОА 3 степени. Также СВФ увеличивает толщину суставного хряща по периферии очага хондрального дефекта.

Применение внутрисуставной инъекции СВФ у пациентов с ОА разных степеней оказывает выраженный терапевтический эффект в течение всего периода наблюдения (отмечается снижение болевого синдрома, увеличение окружности бедра, улучшение функции коленного сустава).

СВФ способен оказывать противовоспалительный эффект на коленный сустав. Это выражается в уменьшении болевого синдрома, уменьшении толщины синовиальной оболочки и объема внутрисуставной жидкости.

У всех пациентов с ОА 1 и 2 степени достигнут хороший клинический эффект, не зависимо от состояния коленного сустава. У пациентов с ОА 3 степени выраженность терапевтического и регенеративного эффекта зависит от индекса массы тела (BMI), степени субхондрального склероза и деформации оси конечности.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РГПУ 260 НА РОСТ НЕЙРИТОВ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ В ПРИСУТСТВИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ 2 ТИПА

Мария Георгиевна Соколова¹, Екатерина Валентиновна Лопатина²

¹ Кафедра неврологии им. С.Н. Давиденкова, Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

sokolova.m08@mail.ru

Введение: ранее был выявлен нейритингибирующий эффект сыворотки крови больных спинальной мышечной атрофией (СМА) 2 типа в органотипической культуре нервной ткани. Цель исследования: изучение влияния РГПУ 260 на процесс ингибирования роста нейритов, в эксперименте с органотипической культуре нервной ткани в присутствии сыворотки крови больных СМА 2 типа. Материалы и методы: 1600 сенсорных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение 3 суток при 36,5°C и 5% CO₂. Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава. 900 ганглиев — культуральная среда и сыворотка крови больных СМА 2 типа (n=12); 700 — ганглиев сыворотка крови больных СМА 2 типа и РГПУ 260 (мефебут : L-аргинина гидрохлорид, 1 : 1) (10⁻⁵ M). Для визуализации объектов использовали микроскоп AxiostarPlus (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия». 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 сыворотка крови на рост нейритов не влияла. Культивирование сенсорных ганглиев в среде, содержащей плазму пациентов со СМА 2 типа (1:70) и РГПУ 260 (мефебут: L-аргинина гидрохлорид, 1:1) (10^{-5} М) устраняло нейритингибирующий эффект плазмы. Индекс площади экспериментальных эксплантатов практически не отличался от контрольного значения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что РГПУ 260 оказывает нейротрофотропное влияние на сенсорные ганглии, усиливая рост нейритов в присутствии сыворотки крови больных СМА. Выводы: выявленное нейротрофотропное действие РГПУ 260, в серии экспериментов в органотипической культуре нервной ткани в присутствии сыворотки крови больных СМА 2 типа, по нашему мнению, связано с влиянием этого препарата на синтез эндотелиальной NO-синтазы.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИАМЕТРОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА НА РАЗНЫХ ПАССАЖАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Анастасия Соловьева¹, Александрова Светлана²

¹ Санкт-Петербургский государственный Политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

testamentinblack@mail.ru

Размер клетки является важным параметром при введении стволовых клеток в кровеносное русло, влияющим на эффективность терапии. Известно, что при длительном культивировании *in vitro* и многократном пассировании с целью увеличения количества клеток могут происходить некоторые функциональные и морфологические изменения клеточных характеристик, в частности, морфометрические. Поэтому необходимы достоверные знания о размерах клеток на разных пассажах.

Цель данной работы состояла в анализе популяции (первичной культуры) мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга кролика в процессе пассирования *in vitro* по показателю — диаметр клетки.

Материалы и методы. В работе использовали МСК костного мозга, выделенные из конечностей новорожденного кролика породы Шиншилла (питомник «Рапполово») 2, 5 и 11 пассажей. Морфометрические параметры (количество клеток с определенным диаметром) получали с помощью автоматического счетчика клеток TC20™ (Bio-Rad, США) и программного пакета.

Результаты. Было выявлено, что на 2 пассаже культивирования первичной культуры МСК диаметр жизнеспособных клеток варьировал от 10 до 29 мкм. Большинство клеток (67%) было сосредоточено в интервале от 15 до 24 мкм. Средний размер клеток составлял 19,8 мкм. Больше всего было представлено клеток диаметром 20 мкм (13%). Анализ популяции клеток 5 пассажа показал, что морфометрические показатели

изменились. Так, верхняя граница диапазона распределения клеток по диаметрам снизилась до 26 мкм, основная доля (65%) популяции приходилась на клетки диаметром от 12 до 20 мкм, средний размер составлял 18,45 мкм. Больше всего в популяции присутствовало клеток диаметром 14 мкм (17,6%). При дальнейшем пассировании (11 пассаж) произошло расширение диапазона размеров клеток от 10 до 29 мкм, средний диаметр составил 20,4 мкм. Основная часть клеток (72%) находилась в размерном ряду от 16 до 26 мкм. Больше всего встречалось клеток диаметром 24 мкм (17%).

Анализ распределения диаметров МСК на разных пассажах показал, что наиболее гомогенной по размерам является популяция клеток 5 пассажа. Кроме того, эти клетки показывали наименьший средний диаметр клетки в популяции. Однако следует учитывать возможные индивидуальные особенности клеточных параметров для каждого образца. Поэтому рекомендуется проводить тестирование клеточной популяции в процессе пассирования по распределению диаметров клеток в популяции для определения оптимального пассажа, пригодного для использования в терапевтических целях.

МОДИФИКАЦИЯ НАНОВОЛОКОН ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ ШИРОКОГО СПЕКТРА ЗАДАЧ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Анастасия Соловьева, Светлана Михайловна Мирошниченко, Антон Михайлович Манахов

НИИКЭЛ — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

solovey_aa@mail.ru

Поликапролактон (PCL) — синтетический полимер, используемый для получения материалов медицинского назначения. Методом электроспиннинга получают PCL нановолокна со структурой внеклеточного матрикса (ВКМ). PCL нановолокна (PCLref) являются супергидрофобными и биологически инертными, что значительно осложняет адгезию клеток и негативно влияет на их дальнейшую судьбу. Одной из перспективных стратегий создания биосовместимой поверхности PCLref является осаждение COOH функциональных групп методом холодной плазменной полимеризации.

В данной работе мы оценили эффективность формирования слоя -COOH групп на поверхности PCLref (PCL-COOH), что позволило физиологически связывать белки без потери их функциональной активности. В качестве белковых молекул использовали плазму, обогащенную тромбоцитами (PRP). Ковалентное связывание PRP к поверхности нановолокон продлевало действие белковых молекул. Наличие образования пептидных связей подтверждено ATR-FTIR и XPS анализами. Показано, что модификация поверхности COOH группами ускоряет скорость распластывания фибробластов (24 часа по сравнению с 3 сутками на PCLref). Дополнительная модификация нановолокон PRP (PCL-COOH-PRP) приводит к нормальному распластыванию клеток за 2 часа. Через 3 суток количество апоптотных фибробластов на PCLref достигало $31 \pm 3,4\%$. Модификация COOH группами повышает биосовместимость PCLref, снижая количество апоптотных клеток до $14 \pm 2,3\%$. Ковалентное присоединение PRP способствует физиологичному росту клеток с минимальным количеством погибших ($3 \pm 0,65\%$), а также активной пролиферации ($12,4 \pm 1,6\%$ против $6,2 \pm 1,2\%$ на PCL-ref). Выживание и пролиферация

на PCLref происходила только в островках клеточной плотности, что связано с активной секрецией фибробластами ВКМ компонентов. На PCL-COOH-PRP клетки располагались равномерно, общее количество более 7 раз превышало PCLref на 7 сутки. Был отмечен различный характер адгезии, распластывания и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на исследуемых материалах, что связано с преобладающей секрецией трофических факторов.

Таким образом, плазменная полимеризация COOH группами PCL нановолокон и последующее связывание белков положительно влияет на адгезию и дальнейшее функционирование клеток. Ионное связывание PRP в 2 раза менее эффективное, чем ковалентное. Исследование демонстрирует широкий потенциал плазменной модификации для задач регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 18-75-10057).

РАЗРАБОТКА НОВОЙ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Александр Сергеевич Сотниченко¹, Ирина Валерьевна Гилевич², Карина Игоревна Мелконян¹, Яна Андреевна Юцкевич¹, Антон Владимирович Каракулев², Сергей Борисович Богданов², Илья Михайлович Быков³, Владимир Алексеевич Порханов², Андрей Николаевич Редько³, Сергей Николаевич Алексеенко³

¹ Лаборатория фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИЛ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия;

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Россия;

³ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

alex24.88@mail.ru

Несмотря на достижения современной хирургии в лечении повреждений кожных покровов актуальным остается поиск новых методов для более быстрого и эффективного заживления ран. Тканевая инженерия, несомненно, представляет интерес для разработки таких технологий.

Цель данной работы состояла в определении оптимального протокола получения децеллюляризованного дермального матрикса для последующей разработки тканеинженерной кожи.

Материалы и методы. Экспериментальным животным был 1 поросенок породы Ландрас. После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы толщиной 0,3 см. В работе проводили сравнительный анализ 2 протоколов децеллюляризации: протокол № 1 на основе применения тритон X100 и дезоксихолата, протокол № 2 только на основе дезоксихолата. Всего циклов обработки по 2 протоколам было 5 с общей продолжительностью проведения децеллюляризации в течение 40 часов. Ацеллюлярные матриксы после обработки были исследованы следующим образом: гистологический анализ, количественное определение содержания ДНК во влажной ткани. Далее была проведена статическая рецеллюляризация матриксов

фибробластами дермы свиньи. После чего матриксы были исследованы на цитотоксичность с помощью ХТТ-теста и теста на дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток.

Результаты: Проведенный сравнительный анализ двух протоколов децеллюляризации дермы свиньи кожи показал, что оба протокола эффективно удаляют клетки и ядерный материал. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме снижалось до 19,8% (65,4 нг/мг ткани) и 12,1% (40,1 нг/мг ткани) по протоколу № 1 и № 2 соответственно. Культивированные клетки сохраняли свою жизнеспособность на обоих полученных матриксах в течение 72 часов. ХТТ-тест выявил в обоих опытных образцах живые, метаболически активные клетки. Однако жизнеспособность клеток оказалась выше на матриксе, децеллюляризованном по протоколу № 1. Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток показало, что 80±10% клеток оставались жизнеспособными на матриксе № 1 и 55±10% на матриксе № 2.

Заключение. Полученные результаты позволили нам считать более перспективным для последующего изучения и проведения исследований *in vivo* именно комбинированный протокол на основе применения Тритон X100 и дезоксихолата натрия.

Работа выполнена при поддержке комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоракальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

НОВЫЕ МЕТОДЫ ХОНДРОПЛАСТИКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

Александр Александрович Стадников¹, Геннадий Михайлович Кавалерский¹, Сергей Васильевич Архипов¹, Максим Анатольевич Макаров²

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

² НИИ Ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия

alexandr_stadnik80@mail.ru

Лечение патологических изменений внутрисуставного гиалинового хряща представляет трудноразрешимую задачу для ортопедии, а проблема полного восстановления активной жизнедеятельности у пациентов с локальными хрящевыми дефектами на сегодняшний день — одна из труднейших задач для врачей-реабилитологов, лечебной физкультуры и спортивной медицины.

Этиологически выделяют два непосредственно предрасполагающих фактора: рассекающий остеохондрит и трансхондральные переломы. Частота встречаемости рассекающего остеохондрита мышечков бедренных костей, или болезни Кёнига, среди всех заболеваний коленного сустава достигает 2%. Патология распространена в основном в возрастных группах 11–13 и 20–40 лет. Исследования биомеханических нарушений аппарата коленного сустава доказали, что понижение прочности хрящевой ткани может быть следствием гормональных, обменных нарушений, перенесенного острого и хронического остеоартрита.

Произведённый систематический обзор гистологических краткосрочных результатов после таких операций, как изолированные артроскопические лаваж сустава,

дебридмент суставной поверхности, абразия суставного хряща, туннелизация и микрофрактурирование субхондральной кости показал формирование функционально несостоятельной фиброзной ткани в зоне повреждения.

Целью научного исследования, проводимом на базе ФБГУ НИИР им. В.А. Насоновой стало улучшение качества жизни пациентов с дефектами гиалинового хряща нагружаемой зоны мышцелков бедра коленного сустава. В ходе работы были сформированы следующие задачи.

- Определить разрешающие способности диагностики суставных дефектов коленного сустава с применением параклинических методов (УЗИ, рентгеновское исследование, МРТ).
- Разработать технологию мини-доступа в коленный сустав для проведения хондропластики коленного сустава по методу AMIC (индуцированный мембранный аутологичный хондрогенез).
- Разработать технологию лечебно-диагностической артроскопии у пациентов с суставными дефектами в коленном суставе.
- Сравнить клинические результаты методов шкал-опросников в короткие и средние сроки после операции.

В результате были созданы алгоритмы мини-доступа и санационной артроскопии в коленный сустав, независимо от локализации повреждения (латеральный или медиальный мышцелок бедра), получены и статистически проанализированы результаты клинического анкетирования, показавшие стойкую положительную динамику функциональных показателей.

НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ HMGV1 И HMGV2 В ХРОМАТИНЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Татьяна Юрьевна Старкова, Антон Владимирович Беляев, Сергей Вячеславович Пономарцев, Алексей Николаевич Томилин

Лаборатория Молекулярной биологии стволовых клеток, ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

t.starkova@incras.ru

Целью данной работы является исследование роли негистоновых белков HmgV1 и HmgV2 в изменениях структурно-функциональных параметров хроматина ЭСК мыши в процессах дифференцировки.

Актуальность исследования в контексте применения ЭСК в медицинской практике обусловлена необходимостью дополнения и систематизирования сведений о роли данных белков в хроматине ЭСК вследствие выявленной зависимости (литературные данные) скорости пролиферации ЭСК, роста злокачественных образований, распространения метастаз и протекания большей части молекулярных механизмов хронического воспаления и заживления от уровня экспрессии и, возможно, статуса пост-трансляционных модификаций HmgV1 и HmgV2.

В рамках поставленных целей нами была создана (методами молекулярного клонирования и CRISPR/Cas9 технологии) линейка нокаутных по HmgV1 и HmgV2 ЭСК мыши. Показано, что CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут генов HmgV1, HmgV2 и HmgV1;HmgV2 одновременно оказывает влияние на фенотип ЭСК, но не приводит к потере их жизнеспособности. С помощью тератом и направленной дифференцировки *in vitro* мы также показали, что

нокаут генов HmgV1, HmgV2 и HmgV1;HmgV2 не оказывает существенного влияния на саму способность дифференцироваться во все три зародышевых листка. Однако, в случае дифференцировки ЭСК нокаутных по HmgV2 и HmgV1;HmgV2 клеток при переходе из наивного (до имплантации) в праймированное (постимплантационное) состояние плюрипотентности *in vitro* наблюдаются задержка дифференцировки и массовая гибель клеток на 5–6 сутки после ее запуска.

С помощью FT(ICR)MS нами выявлены функционально значимые различия в статусе пост-трансляционных модификаций HmgV1 дифференцированных и ЭСК мыши, в частности AcK2 и deAcK81 (ЭСК), что, согласно литературным данным, приводит к потере способности изгибать ДНК при связывании и, вероятно, должно повлечь за собой изменение функциональной нагрузки HmgV1 в хроматине ЭСК. С целью исследования биологической роли данных модификаций методами молекулярного клонирования (точечный мутагенез) и CRISPR/Cas9-опосредованного нокина генов в настоящее время ведется работа по созданию клеточных линий с мутантной формой белка.

Полученные в ходе выполнения работы сведения могут лучше понять и, следовательно, контролировать процессы дифференцировки ЭСК и тем самым, ускорят внедрение плюрипотентных стволовых клеток в практическую медицину.

Гранты. Работа выполнена на базе ФГБУН ИИЦ РАН при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ 18-04-01199).

МУОД-ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ DYSF, РАССМАТРИВАЕМАЯ КАК ТЕСТ- СИСТЕМА ДЛЯ СКРИНИНГА ПРЕПАРАТОВ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ

Ирина Георгиевна Старостина¹, Дарья Сергеевна Чулпанова¹, Алиса Алмазовна Шаймарданова¹, Валерия Владимировна Соловьева¹, Иван Антонович Яковлев^{1,4}, Роман Вадимович Деев^{2,3}, Артур Александрович Исаев², Альберт Анатольевич Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Genotarget LLC, Москва, Россия

fairin@mail.ru

Дисферлинопатии возникают в связи с мутациями в гене *DYSF*, которые вызывают дефицит дисферлина в саркомерме. Воспалительная клеточная инфильтрация может быть характерной чертой дисферлинопатии, группы мышечных дистрофий, наследуемых по аутосомно-рецессивному типу. В первую очередь при данном заболевании поражаются мышцы конечностей, бедер и плеч, что приводит к прогрессирующему нарушению ходьбы. Эффективного лечения для этих заболеваний пока нет. Поиск подхода генной терапии мышечных дистрофий требует соответствующей модели заболевания *in vitro*. Поскольку получение биопсии мышц от пациентов с таким орфанным заболеванием для выделения и культивирования клеток в лаборатории достаточно затруднительно

или вообще невозможно, нами была разработана тест-система на основе дермальных фибробластов пациента с дисферлинопатией. В нашем исследовании мы взяли дермальные фибробласты, выделенные из дермальной ткани пациента с дисферлинопатией (мутация в гене *DYSF*, экзон 26). Фибробласты пациента были иммортализованы. Используя наработанный лентивирус LV-TRE-VP64-human-MyoD-T2A-dsRedExpress2 с тетрациклин-индуцибельным промотором (Tet-ON) клетки были генетически модифицированы и отселектированы для осуществления миогенной дифференцировки. В результате, после получения чистой популяции клеток и индукции экспрессии генов доксициклином с использованием инвертированного микроскопа AxioOberver.Z1 наблюдали слияние клеток и образование миофибриллярных структур. Для анализа эффективности миогенной дифференцировки был проведен Вестерн-блоттинг, который выявил положительную реакцию с моноклональными антителами к белку MyoD (sc-377460), размер бэнда соответствовал ожидаемому размеру белка MyoD (45 кДа). Затем, с целью анализа присутствия мРНК дисферлина в модифицированных миобластах была проведена ПЦР в реальном времени, которая выявила небольшую экспрессию дисферлина в экспериментальных образцах. Полученную MyoD-индуцированную клеточную линию миобластов можно использовать в качестве тест-системы для новых подходов к терапии дисферлинопатий.

Работа поддержана Программой повышения конкурентоспособности КФУ.

МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК HEK293A С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS9 SAM ДЛЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВАЦИИ ГЕНА ДИСФЕРЛИНА

Ирина Георгиевна Старостина¹, Алиса Алмазовна Шаймарданова¹, Диана Рустамовна Аглиуллина¹, Валерия Владимировна Соловьева¹, Иван Антонович Яковлев^{1,4}, Артур Александрович Исаев², Роман Вадимович Деев^{2,3}, Альберт Анатольевич Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Genotarget LLC, Москва, Россия

fairin@mail.ru

Дисферлинопатия — группа мышечных дистрофий с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникающие вследствие мутаций в гене дисферлина человека. Белок дисферлин (англ. Dysferlin, *DYSF*) играет ключевую роль в восстановлении сарколеммы при ее повреждении. Синтез дефектного белка приводит к нарушению репаративных процессов в мышечной ткани и последующей атрофии. Разнообразные исследования направлены на лечение этого наследственного заболевания, однако дисферлинопатия остается неизлечимой на данный момент. Одной из основных причин низкой эффективности методов лечения является отсутствие модели, наиболее точно воспроизводящей патологические процессы заболевания. Модели на основе животных широко используются, но ввиду значительных генетических различий они не способны в полной мере воспроизвести

все особенности развития болезни в сравнении с человеком. Перспективным способом лечения дисферлинопатии в настоящее время является генная терапия и модельные системы, основанные на клеточных линиях человека, экспрессирующих дисферлин, которые представляют интерес для тестирования новых генно-терапевтических препаратов. Целью нашей работы было создание тест-системы с использованием технологии CRISPR-Cas9 SAM *in vitro* для разработки и скрининга препаратов для лечения дисферлинопатии. Активацию транскрипции мРНК гена *DYSF* в клетках HEK293A осуществляли с использованием полученных рекомбинантных лентивирусов, кодирующих факторы транскрипции MS2-P65-HSF1, dCas9-VP64 и специфическую гидовую РНК дисферлина. Селекцию успешно трансдуцированных клеток проводили рядом антибиотиков (зеоцин, бластицидин, гидромицин), специфичных соответственно каждому лентивирусу, с целью получения чистой популяции инфицированных клеток. Экспрессия белка дисферлина была подтверждена с помощью вестерн-блоттинга. Клеточная линия HEK293A с экспрессией дисферлина, полученная путем транскрипционной активации гена *DYSF* с использованием системы CRISPR-Cas9 SAM, может быть использована в дальнейших исследованиях терапевтического подхода путем редактирования РНК и ДНК клеток, а также для скрининга лекарственных препаратов при лечении дисферлинопатий человека.

Работа поддержана Программой повышения конкурентоспособности КФУ.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЖЕВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С МОРБИДНЫМ ОЖИРЕНИЕМ И НАЛИЧИЕМ/ОТСУТСТВИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Юрий Сергеевич Стафеев¹, Светлана Сергеевна Мичурина^{1,2}, Никита Владимирович Подкуйченко^{1,2}, Игорь Александрович Скляник³, Екатерина Алексеевна Шестакова³, Камиль Абусаидович Яхьяев³, Анатолий Владимирович Юрасов⁴, Александр Вячеславович Воронников¹, Михаил Юрьевич Меньшиков¹, Марина Владимировна Шестакова³, Елена Викторовна Парфенова^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Эндокринологический научный центр Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ Центральная клиническая больница № 1 ОАО РЖД, Москва, Россия

yuristafeev@gmail.com

Введение. Ожирение и сахарный диабет 2 типа (СД2Т) в современной медицине являются ведущими причинами смертности населения. Особую роль в развитии инсулиновой резистентности (ИР), которая является основным молекулярным проявлением СД2Т, играет нарушение бежевой дифференцировки адипоцитов и их термогенной активности. Целью данной работы было изучить термогенный потенциал мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т.

Методы. В работу были включены пациенты с длительным (>15 лет) и морбидным (ИМТ>35кг/м²) ожирением, а также наличием/отсутствием СД2Т. Оценивали клиническую характеристику пациентов и оценивали инсулиновую чувствительность пациентов, после чего проводили забор подкожной жировой ткани и выделение МСК ЖТ с последующей бежевой адипоцитарной дифференцировкой в присутствии триидотирона и изопротеренола. Эффективность дифференцировки оценивали с помощью оценки уровня мРНК маркеров бежевого жира (UCP-1, PGC1 α , GLUT4, FABP4), а также уровня белка UCP-1. Уровень общих и митохондриальных АФК в бежевых адипоцитах оценивали с помощью красителей DCFDA и MitoSOX соответственно. Активность липолиза и дыхательной цепи оценивали с помощью оценки уровня мРНК АТР5В, СОХ411, АСС, LCAD, а также фосфорилированных АСС и HSL. Оценку глюкозного метаболизма бежевых адипоцитов проводили с помощью исследования инсулин-стимулируемого захвата [3Н]-2-дезоксиглюкозы.

Результаты. В ходе работы мы продемонстрировали, что МСК ЖТ пациентов с СД2Т обладают сниженной способностью к формированию бежевых адипоцитов. Нарушение бежевой дифференцировки сопряжено с неизменным общим уровнем АФК, но с повышенным уровнем роста митохондриальных АФК в ходе бежевой дифференцировки в адипоцитах пациентов с СД2Т. В обеих группах состояние липолиза было одинаковым, однако экспрессия генов дыхательной цепи была в 2 раза снижена у пациентов с СД2Т. Оценка инсулин-стимулируемого захвата глюкозы продемонстрировала повышение базального захвата глюкозы у адипоцитов пациентов с СД2Т.

Заключение. Полученные результаты продемонстрировали сниженный потенциал к бежевой адипогенной дифференцировке МСК ЖТ пациентов с СД2Т. По-видимому, нарушение бежевой адипогенной дифференцировки МСК ЖТ адипоцитов пациентов с СД2Т приводит к нарушениям функции митохондрий полученных бежевых адипоцитов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-15-01435.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОБКЛАДОЧНЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА И КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ СПИННОГО МОЗГА

Ольга Владиславовна Степанова¹, Анастасия Денисовна Воронова¹, Андрей Викторович Чадин¹, Марат Петрович Валихов¹, Алевтина Сергеевна Семкина^{1,3}, Игорь Владимирович Решетов², Владимир Павлович Чехонин^{1,3}

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия;

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

sms-34@yandex.ru

Введение. Патологические процессы, развивающиеся в результате травм спинного мозга, часто приводят к образованию кист, формирование которых препятствует регенерации спинного мозга и проведению нервных

импульсов. Существующие хирургические и медикаментозные методы лечения не позволяют в полной мере добиться выздоровления пациентов. Одним из перспективных направлений в этой области является клеточная терапия. Значительные эффекты на регенерацию спинного мозга показали обкладочные клетки обонятельной выстилки носа. Однако использование данных клеток оставалось неизученным при терапии посттравматических кист спинного мозга.

Цель. Оценить эффективность трансплантации обкладочных клеток обонятельной выстилки человека и крыс при посттравматических кистах спинного мозга.

Материал и методы. В исследовании были использованы образцы обонятельной выстилки, полученные из верхних носовых ходов от 30 пациентов при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1 и 30 образцов обонятельной выстилки крыс линии Wistar. Выживаемость обкладочных клеток в кистах оценивали по выявлению РКН-26 меченых клеток. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после операции. Трансплантацию обкладочных клеток крыс и человека проводили в полость кисты в количестве 750 тысяч клеток (n = 10) и 1,5 миллионов клеток (n = 10) в 25 мкл среды DMEM/F12(1:1). Контрольной группе (n=12) вводили то же количество среды без клеток. В течение 4 недель после трансплантации оценивали восстановление подвижности задних конечностей крыс, используя 21-балльную шкалу открытого поля (BBB).

Результаты. Было впервые установлено, что обкладочные клетки человека и крыс выживают в кистах в течение 4 недель. В данной работе впервые были определены необходимые количества обкладочных клеток человека и крыс, при трансплантации которых наблюдается улучшение двигательной подвижности задних конечностей крыс.

Выводы. Выявленная эффективность аллогенной и ксеногенной трансплантации обкладочных клеток позволяет предположить, что применение аутологичных обкладочных клеток пациентов с кистами спинного мозга будет также эффективно при лечении этих пациентов, что особенно важно для персонализированной медицины будущего.

Работа была поддержана грантом РНФ 17-15-01133: Изучение терапевтического эффекта нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток обонятельной выстилки носа при экспериментальной травме спинного мозга.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ЭНДОГЛИНУ ЧЕЛОВЕКА ВЫЗЫВАЮТ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ EA.HY926 И HUVEC

Анастасия Юрьевна Столбовая^{1,2}, Илья Валерьевич Смирнов^{1,2}, Агния Александровна Пиневиц¹, Наталья Левоновна Вартамян¹, Дарья Сергеевна Семенова³, Анна Борисовна Малашичева³, Марина Платоновна Самойлович¹

¹ РНЦ радиологии и хирургических технологий им. А.М. Гранова, пос.Песочный, Россия;

² НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им.Д.О. Отто, Санкт-Петербург, Россия;

³ НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

anastasia.stolbovaya@gmail.com

Формирование сосудов играет важную роль в процессе эмбрионального развития, при регенерации тканей и при злокачественных новообразованиях. Эндоглин,

маркерный белок эндотелия сосудов, входит в состав рецепторного комплекса TGF- β и участвует в различных этапах ангиогенеза: пролиферации, миграции и адгезии эндотелиоцитов.

Целью работы являлось сравнение действия двух моноклональных антител (МКАТ, 2С8 и 4Е4) к различным эпитомам эндотелия человека на адгезию, миграцию и на формирование капилляро-подобных структур клетками эндотелия перевиваемой линии EA.hy926 и первичных культур клеток эндотелия пупочных канатиков (HUVES).

Методами ОТПЦР и проточной цитометрии показано, что транскрипционная активность гена *Eng* и экспрессия мембранной формы белка в клетках HUVES были выше, чем в эндотелиальных клетках линии EA.hy926. Снижение уровня O₂ при культивировании клеток с 20% до 2% приводило к увеличению экспрессии эндотелина. Экспрессия адгезионных молекул CD49e, CD54, CD144 и CD146 на поверхности клеток HUVES также была выше, чем на клетках EA.hy926.

В культурах клеток HUVES наблюдали торможение миграции клеток в тесте закрытия раны в клеточном монослое при добавлении МКАТ 4Е4. Оба антитела вызывали замедление миграции клеток при культивировании в условиях гипоксии или при добавлении в среду TGF- β 1. Торможение миграции клеток EA.hy926 в присутствии обоих МКАТ было отмечено только при добавлении TGF- β 1.

В отличие от клеток EA.hy926, оба МКАТ к эндотелину вызывали уменьшение расщепления клеток HUVES на поверхности, покрытой фибронектином. Тем не менее, добавление МКАТ 4Е4 также вызывали изменения адгезионных свойств клеток EA.hy926. В присутствии этого антитела происходило увеличение числа моноцитоподобных клеток U937, прикрепившихся к монослою эндотелия.

Нами были получены данные, свидетельствующие о наличии влияния обоих МКАТ к эндотелину на формирование капилляро-подобных структур в матригеле клетками EA.hy926 и HUVES.

Проведенные исследования позволяют заключить, что оба МКАТ вызывают функциональные изменения в культурах эндотелиальных клеток, однако их влияние не идентично. Также наши результаты свидетельствуют о том, что эффекты МКАТ оказываются более выраженными при проведении экспериментов на первичных культурах клеток эндотелия HUVES, что может быть связано с более высокими уровнями экспрессии эндотелина и адгезионных молекул этих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01230.

КЛОНЫ НК-КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ CD57⁺NKG2C⁺ ОБЛАДАЮТ ЛУЧШЕЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬЮ, ПО СРАВНЕНИЮ С КЛОНАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ИЗ СУБПОПУЛЯЦИИ CD57⁺NKG2C⁻

Мария Алексеевна Стрельцова, Софья Алексеевна Ерохина, Полина Андреевна Кобызева, Анна Александровна Бойко, Елена Ивановна Коваленко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

mstreltsova@mail.ru

Цитомегаловирусная инфекция (HCMV) способствует формированию в организме человека особой субпопуляции адаптивных НК-клеток, которые отличаются

от обычных НК-клеток рядом функциональных свойств, в частности, повышенной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью. Субпопуляция ассоциированных с HCMV адаптивных НК-клеток характеризуется фенотипом CD56^{dim}CD57⁺NKG2A⁻NKG2C⁺CD16^{bright}. В данной работе мы изучили различия между НК-клетками NKG2C⁻ и NKG2C⁺ по эффективности клонирования, а также по выживаемости и продолжительности жизни клональных культур *in vitro*. НК-клетки выделяли путем отрицательной магнитной сепарации периферических мононуклеаров, полученных от HCMV-серопозитивных здоровых доноров. Шесть коллекций клонов НК-клеток были получены путем сортировки единичных клеток в 96-луночный планшет. Для стимуляции использовали среду NK-MACS, дополненную 100 ед./мл IL-2, и модифицированные фидерные клетки K562-mblL21. Были получены клоны из субпопуляций CD57⁻NKG2C⁻, CD57⁻NKG2C⁺, CD57⁺NKG2C⁻ and CD57⁺NKG2C⁺. Не было выявлено отличий в эффективности клонирования НК-клеток NKG2C⁻ и NKG2C⁺. Общее количество клеток в клоне в клональных культурах из субпопуляций NKG2C⁺ в большинстве коллекций было выше, чем в клонах, полученных из NKG2C⁻-субпопуляций. Различия в доле выживших клонов через 7 недель культивирования от общего количества клонов, оказались меньше для клонов, полученных из клеток CD57⁻NKG2C⁻ и CD57⁻NKG2C⁺ (41% и 57%, соответственно), чем для клонов из субпопуляций CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺ (23% и 66%, соответственно). Выживаемость клонов из субпопуляций CD57⁻NKG2C⁻ через 5–8 недель оказалась выше, чем в клонах из CD57⁺NKG2C⁻. Такие же различия были получены и для клонов из субпопуляций CD57⁻NKG2C⁺ и CD57⁺NKG2C⁺. Продолжительность жизни была выше в клонах, полученных из НК-клеток NKG2C⁺, и достигала 13 и более недель. Однако, хорошо пролиферирующие клоны «адаптивных» НК-клеток наблюдались не у всех доноров, даже при одинаковой пропорции НК-клеток NKG2C⁺. Таким образом, экспрессия NKG2C связана с лучшей пролиферацией и более высокой выживаемостью клонов НК-клеток в ответ на стимуляцию IL-2/K562-mblL21.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 19-15-00439.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СУБПОПУЛЯЦИИ НК-КЛЕТОК CD57⁺NKG2C⁺

Мария Алексеевна Стрельцова, Софья Алексеевна Ерохина, Полина Андреевна Кобызева, Леонид Михайлович Каневский, Мария Владимировна Гречихина, Елена Ивановна Коваленко

Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

lenkovalen@mail.ru

При инфекции цитомегаловируса в периферической крови человека во многих случаях наблюдается экспансия так называемых адаптивных НК-клеток с фенотипом CD57⁺NKG2C⁺. Ряд свойств этой субпопуляции, связанных с эпигенетической перестройкой, позволяет их рассматривать как перспективных агентов противоопухолевой иммунотерапии. С целью определить гетерогенность НК-клеток NKG2C⁺ и их отличие от клеток NKG2C⁻ в ответе на активирующий стимул в данной работе был проведен фенотипический анализ

клональных культур, полученных из соответствующих субпопуляций CD57⁺. NK-клетки были выделены из периферических мононуклеаров здоровых доноров с помощью магнитной сепарации. Стимуляцию проводили IL-2 с использованием облученных фидерных клеток K562-mbIL21. С помощью клеточной сортировки было получено 6 коллекций клонов из NK-клеток CD57⁺, CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺. Анализ фенотипа полученных культур был выполнен через 5 недель культивирования с помощью проточной цитометрии. Процентное содержание клеток, экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD57, в клонах, полученных из субпопуляции CD57⁺, составляло 56.4 ± 8.7% (среднее ± SE). В то же время, доля CD57⁺-клеток отличалась в клонах, полученных из NK-клеток, различных по экспрессии NKG2C, составляя 43.2 ± 15.7% и 75.3 ± 9.3% для субпопуляций CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺, соответственно. Более того, в 75% клонов, полученных из клеток CD57⁺NKG2C⁺, все клетки в культурах были CD57-позитивными. Интересно, что плотность поверхностной экспрессии активационного маркера HLA-DR была выше в клетках клонов, происходящих из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, по сравнению с клонами из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻, хотя не все клетки клонов экспрессировали этот маркер. При этом, плотность поверхностной экспрессии CD16 в этих клонах снижалась, что может быть связано с более интенсивной пролиферацией CD57⁺NKG2C⁻-NK-клеток в ответ на данный тип стимуляции. Приблизительно половина клонов из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻ были полностью негативными по KIR2DL2/DL3, тогда как только 18% клонов, полученных из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, не экспрессировало эти ингибирующие рецепторы. Таким образом, большая часть клональных культур, полученных из клеток CD57⁺NKG2C⁺, сохраняла такие фенотипические характеристики адаптивных NK-клеток, как экспрессию CD57 и KIR2DL2/DL3, обладала более высоким статусом активации, но более низким уровнем рецепторов антитело-зависимой цитотоксичности CD16.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-15-00439.

РЕПАРАТИВНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗЖЕКЕ МОЛОДИ СИМЫ ОНСОРНУНСНУS MASOU ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Мария Евгеньевна Стуканёва¹, Евгения Владиславовна Пущина¹, Дмитрий Константинович Обухов²

¹ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, Владивосток, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Stykanyova@mail.ru

Для исследования репаративного нейрогенеза в мозжке молодки симы были выбраны следующие молекулярные маркеры: для характеристики процессов пролиферации — PCNA и BrdU; глиогенеза и радиальной глии — GFAP и GS, CBS — фермент синтеза сероводорода, нейродифференциации — HuCD. Нестин и виментин использовали для анализа распределения нейрональных клеток-предшественников. TUNEL анализ применялся для идентификации апоптозных элементов с помощью маркирования терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы. Путём прокальвания черепа рыбы тонкой иглой наносили рану глубиной в 1 мм в тело мозжечка. После

повреждения возрастало число TUNEL⁺ плотных апоптозных телец, представляющих собой финальные стадии крупнозернистой конденсации хроматина и апоптотической деградации клеток. Число GS⁺ клеток увеличивалось и мы полагаем, что GS может маркировать как глутамат-эргические нейроны, содержащие GS в качестве фермента, метаболизирующего глутамат, так и астроцитоподобные клетки, осуществляющие детоксикацию глутамата, захваченного из межклеточного пространства. После повреждения происходила реактивация конститутивных пролиферативных зон с последующей трансформацией в реактивные нейрогенные ниши, содержащие PCNA⁺, BrdU⁺, нестин⁺, виментин⁺ клетки. Возможно, мелкие клетки-предшественники фенотипически соответствуют популяциям нейрональных стволовых клеток, чья пролиферативная активность значительно увеличивается в случае травмы. Максимальная пролиферативная активность нейрогенных ниш и высокая концентрация CBS⁺ клеток в этих областях предполагает, что H₂S участвует в регуляции пролиферативной активности. В районе нейрогенных ниш выявлялись GFAP⁺ волокна радиальной глии, в дорсальной матричной зоне (ДМЗ) они формировали разнонаправленно ориентированные пучки. По этим волокнам клетки из активированных нейрогенных ниш и ДМЗ мигрируют к месту нанесения травмы, восстанавливая поврежденную ткань. Наиболее крупным образом, содержащим пролиферирующие PCNA⁺, BrdU⁺, нестин⁺, виментин⁺ клетки, была ДМЗ. Вероятно, после повреждения мозжечка зоны пролиферации производят, в основном, HuCD⁺ нейроны, ускоряется нейрональная дифференциация клеток, которые интегрируются в зрелые нейронные сети. В ходе репаративного нейрогенеза поврежденные клетки уничтожаются путем апоптоза, нейтрализуются эффекты нейровоспаления, начинается активная пролиферация, глиогенез и ускоренная дифференциация новых клеток, которые мигрируют к месту повреждения, восстанавливая ткань.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПРИМЕНЕНИЮ МИТОТИЧЕСКИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Алена Сергеевна Ступникова^{1,4}, Ирина Сергеевна Захарова¹⁻³, Александр Игоревич Швеценко¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия;

² НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

alena.st97@gmail.com

В настоящее время наблюдается рост числа заболеваний с патологией кровеносных сосудов. Различные типы васкулярных эндотелиальных и гладкомышечных клеток используются в качестве модельных систем для изучения ряда заболеваний и считаются перспективным источником для регенеративной медицины.

Серьезным препятствием для применения любого типа делящихся клеток в лечении заболеваний человека является риск того, что после введения в организм пациента они могут образовать опухоли. Поэтому важной задачей является исследование возможности

использования клеток человека, в которых инактивирована способность к митозу.

В этой связи целью данной работы является исследование регенеративного потенциала митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из отходного послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека.

В результате выполнения работы создана методика получения митотически инактивированных пациент-специфических васкулярных клеток из материала кардиальных эксплантов человека. Показано, что, несмотря на инактивацию пролиферации, эндотелиальные и гладкомышечные клетки демонстрируют жизнеспособность на уровне более 92%. Полученные клетки сохраняют свои морфофункциональные свойства *in vitro*: в эндотелиальных клетках сохраняются факторы CD31, vWF и способность нарабатывать компоненты межклеточного матрикса: коллаген 4 типа, фибронектин. Гладкомышечные клетки позитивны по α -актину гладких мышц, тяжелой цепи гладкомышечного миозина, нарабатывают эластин; эндотелиальные клетки также сохраняют способность формировать капилляроподобные структуры в матриксе. Клеточные популяции митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток демонстрируют высокий ангиогенный потенциал *in vivo* на модели иммунодефицитных мышей SCID. В составе тканеинженерных конструкций из поликапролактона и хитозана клетки сохраняют специфические поверхностные антигены и способность к наработке межклеточного матрикса.

Таким образом, митотически инактивированные васкулярные клетки человека потенциально могут быть применены для разработки методов терапевтического ангиогенеза в лечении ишемических поражений, а также для получения клеточно-заселенных тканеинженерных конструкций, пригодных для сосудистой хирургии. Разработанные в ходе реализации проекта методы могут быть применены для создания биомедицинского клеточного продукта.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НЕОДИМА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ОТСУТСТВИЯ СВОБОДНЫХ ФОСФАТОВ

Анастасия Михайловна Суббот¹, Иван Александрович Новиков¹, Олег Александрович Гусев², Наталья Евгеньевна Гоголева², Елена Ильясовна Шагмарданова², Сабина Александровна Кондратьева²

¹ *Лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия;*

² *Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

kletkagb@gmail.com

Введение. Данные о воздействии соединений редкоземельных элементов (РЗЭ) на культуры клеток разнятся. Описаны как стимуляция пролиферации, так и индукция апоптоза. В ряде случаев эффект дозозависимый, в других наблюдается гормезис. Естественно, часть данных явлений может зависеть от условий проведения эксперимента и выбранного клеточного типа. Тем не менее, интерпретация эффекта как правило сводится к индукции молекулярных ответов на блокировку РЗЭ кальций-зависимых

систем клетки, а другие события, возникающие при попадании растворимых соединений РЗЭ в питательную среду остаются без внимания. Так, известно, что при добавлении хлоридов лантаноидов к питательной среде в концентрации, превышающей десятки микромолей, происходит образование нерастворимых микрочастиц фосфатов лантаноидов, среда обедняется свободными фосфатами. Возможно, воздействие РЗЭ на клетки более объективно изучать в безфосфорных условиях, хотя такая постановка эксперимента и ограничивает исследователя относительно короткими экспозициями.

Материалы и методы. Было изучено воздействие изотонического раствора, содержащего Nd^{3+} в концентрации 50 мМ на клетки двух типов: фибробласты стромы роговицы и клеточная линия А549. После промывки 0,9% раствором NaCl клетки экспонировали в указанном растворе лантаноида от 30 сек. до 24 ч, после чего снова промывали 0,9% раствором NaCl и возвращали в питательную среду.

Результаты. Было обнаружено, что после экспозиции до 30 мин. жизнеспособность клеток обоих типов не отличается от интактных контролей (сохраняется пролиферативная, миграционная, митохондриальная, кальцеиновая активность, проницаемость мембран не изменяется). После 1 ч экспозиции в культурах наблюдались дегенеративные изменения, а после 24 ч экспозиции клетки утрачивали признаки жизнеспособности. При этом непосредственно во время экспозиции в клетках визуально не выявлялись динамические процессы (митоз и движение митохондрий), однако уже после промывки они возобновлялись.

Выводы. Было показано, что летального эффекта на клетки от кратковременного воздействия достаточно высоких концентраций РЗЭ в безфосфорных растворах не наблюдается, а часть наблюдений, описанных ранее, может быть обусловлена алиментарным недостатком свободных фосфатов в окружении клетки. Таким образом, необходимо с осторожностью интерпретировать цитотоксические эффекты РЗЭ. При помещении клетки в раствор РЗЭ наблюдается обратимая остановка динамических процессов, что может быть прим.мо в исследованиях гипобиоза.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ В УСЛОВИЯХ НАРУШЕННОГО МИНЕРАЛЬНОГО БАЛАНСА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА КЕРАТОКОНУСА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РОГОВИЦЫ

Анастасия Михайловна Суббот¹, Николай Михайлович Югай³, Юрий Михайлович Ефремов², Петр Сергеевич Тимашев², Иван Александрович Новиков¹

¹ *Лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия;*

² *Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;*

³ *ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

kletkagb@gmail.com

Введение. Ранее показана вовлеченность микроэлементов халькофильной группы Cu, Zn и Fe, в патогенез кератоконуса (КК) и рецидивирующей эрозии роговицы (РЭР). Вероятно, деструктивный эффект обеднения ткани

этим элементом реализуется через нарушение активности ферментов, метаболизирующих коллаген, в том числе LOX и MMP, и оксидативного стресса, вызванного нарушением работы СОД.

Отсутствие адекватной животной модели КК, делает актуальным использование клеточных моделей, в том числе тканеподобных структур, которые позволяют работать с человеческим материалом и дают возможность контролировать микроэлементный состав клеточного окружения.

Изучению клеточной системы в условиях дефицита цинка и меди посвящено не так много работ, вероятно это отчасти связано с отсутствием общепринятых подходов к селективному удалению этих элементов из «стандартной» культуральной среды сложного состава. Однако некоторые наработки в этой области все же имеются. Взяв за основу способ обеднения двухвалентными ионами биологических сред ионообменной смолой, мы показали возможность значительного селективного обеднения FBS одним из целевых элементов и протестировали возможность роста кератоцитов на полученной среде, сравнив биомеханические свойства клеточных пластов выращенных в стандартных условиях и в условиях дефицита цинка.

Материалы и методы. Клетки стромы роговицы человека 3 пассажа, в концентрации 300 тыс./см², культивировали на среде, содержащей 10% FBS, в контрольных образцах — интактной, в опытных — пропущенной через колонку с ионообменной смолой Chelex-100. Заверка содержания микроэлементов проводилась методом ICP-MS. Биомеханические свойства полученных клеточных пластов анализировали на атомно-силовом микроскопе.

Результаты. Представленным способом нам удалось добиться снижения концентрации цинка в 10 раз по сравнению с исходной. Культивированные в обедненной среде клеточные пласты демонстрируют более высокий показатель жесткости чем контрольные образцы, что подтверждает тезис о том, что баланс микроэлементов в ткани роговицы может играть ведущую роль в патогенезе КК. Кроме того, среда обедненная по цинку может быть компонентом модельной системы для изучения РЭР, т.к. в ней будет снижена активность MMP.

Работа выполнена в рамках НИР «Инновационные подходы к изучению патогенеза, диагностике и хирургическому лечению заболеваний хрусталика и роговицы на основе морфологического, ультраструктурного и биомеханического анализа» № 0511-2019-0009.

ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ С КЛЕТКАМИ ЛИМБА РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА, ПРИМЕНЯЮЩИХСЯ В АНТИГЛАУКОМНОЙ ХИРУРГИИ

**Анастасия Михайловна Суббот,
Наталья Владимировна Фисенко**

ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия

kletkagb@gmail.com

Введение. В настоящее время самым распространенным скаффолдом, применяемым в тканевой инженерии, является коллаген, что обусловлено его слабой антигенностью и резорбируемостью в тканях реципиента. В офтальмологии коллагеновые матрицы используют в качестве субконъюнктивальных и интрасклеральных дренажей для профилактики избыточного рубцевания сформированных при антиглаукомных операциях путей

оттока внутриглазной жидкости. Перспективным является применение тканеинженерных конструкций, заселенных клетками активно препятствующими фиброзированию, например, коллагеновый матрикс, заселенный МСК. Поэтому оценка биосовместимости потенциальных материалов и клеток для таких конструкций остается актуальной задачей.

Цель: оценить в эксперименте *in vitro* биосовместимость с клетками лимба роговицы человека различных матриксов на основе коллагена (гемостатической коллагеновой губки и офтальмологического дренажа iGen).

Материалы и методы. Фрагменты гемостатической коллагеновой губки и дренажа iGen размерами 2×2×2 мм заселяли клетками лимба роговицы человека 4 пассажа, в концентрации 30 тыс./мл. Культивирование проводили на среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и смесь антибиотиков/ антимикотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Визуализацию осуществляли на инвертированном флуоресцентном микроскопе через 1 и 7 суток после засева при окраске Calcein AM и Hoechst 33342.

Результаты. Через 1 сутки культивирования определяются единичные клетки в глубоких слоях гемостатической губки и дренажа iGen. Клетки имеют характерное веретеновидное строение, распластываются по поверхности матрикса и стремятся к адгезии к коллагеновым волокнам. К 7 суткам культивирования отмечается значительное увеличение количества клеток, формирующих сетчатую структуру, выстилающую внутреннюю и наружную поверхности матриксов. Клетки имеют вытянутую веретеновидную форму и овальное ядро. Во многих клетках можно отметить наличие двух ядер. Практически отсутствуют погибшие клетки. Распределение клеток является равномерным и не отличается между разными типами исследованных матриксов.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о высокой биосовместимости с клетками лимба роговицы человека гемостатической губки и дренажа iGen и их низкой цитотоксичности, что предполагает возможность их использования в качестве носителя для создания тканеинженерных конструкций прим.м.ых в офтальмохирургии.

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Елена Александровна Супруненко¹, Елизавета Алексеевна Сазонова¹, Александр Михайлович Куринов², Евгений Геннадиевич Евтушенко¹

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

suprunenkoe@mail.ru

Исследования механизмов, регулирующих участие стволовых клеток человека в обеспечении регенерационных способностей тканей, открывают широкие перспективы их применения в регенерационной биомедицине. Известно, что регенерация ткани может осуществляться не только за счет прямой дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нужном направлении, но и за счет их участия в специфической регуляции репаративных процессов. В связи с этим, большой практический интерес представляет изучение компонентов паракринной секреции стволовых клеток, обеспечивающих

межклеточную коммуникацию и способных регулировать морфофункциональное состояние клеток. Одними из таких паракринных регуляторных компонентов стволовых клеток являются секретлируемые ими внеклеточные везикулы, представляющие собой мембранные замкнутые цитоплазматические фрагменты и содержащие различный набор белков, липидов, нуклеиновых кислот. Сопоставление компонентов везикул и самих стволовых клеток может указывать на регуляторный аспект паракринной функции клеток.

В данной работе мы сопоставили наличие ряда ключевых характеристических факторов в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК) и во внеклеточных везикулах, полученных в ходе их культивирования.

В работе были использованы ЭСК человека линии hES-MKO5 любезно предоставленные чл.-корр. РАН, д.б.н. М.А. Лагарьковой (ФНКЦ ФХМ ФМБА). Клетки культивировали по стандартной методике, используя в качестве подложки матригель. Внеклеточные везикулы выделяли из среды культивирования ЭСК методом последовательного центрифугирования и ультрацентрифугирования по стандартной методике. Концентрация везикул составляла в среднем $4,6 \times 10^{11}$ част./мл, 80% детектируемых частиц лежат в диапазоне размеров от 50 до 200 нм, что свидетельствует о присутствии в препаратах как экзосом, так и микровезикул. Результаты просвечивающей электронной микроскопии подтверждают наличие частиц, по морфологии соответствующих везикулам. Проведенный нами молекулярно-генетический анализ (метод ПЦР в реальном времени) показал наличие мРНК генов — основных маркеров плюрипотентности (Oct4, Sox2, Nanog, Lin 28) в самих ЭСК человека линии hES-MKO5 и в их внеклеточных везикулах.

Таким образом, выявленная идентичность паракринного компонента ЭСК может указывать на то, что при сохранении плюрипотентного статуса клеток межклеточные коммуникации направлены на поддержание плюрипотентности.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГАРМОНИЗАЦИИ И РАЗВИТИЯ ТЕРМИНОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ОБЛАСТИ БИМЕДИЦИНЫ

Елизавета Рафаэлевна Сурина, Жанна Алексеевна Акопян, Ляля Адыгамовна Габбасова
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ESurina@mc.msu.ru

Биомедицина, возникшая на стыке фундаментальных, преимущественно естественных наук, определяет новое направление в развитии медицины высоких технологий. Принятие Конвенции о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины («Конвенции Овьедо») в 1997 году можно считать началом эпохи биомедицины. Количество публикаций в этой области с каждым годом значительно возрастает, и на данный момент составляет уже около 50000 источников по базе данных PubMed. Тем не менее, вопросы гармонизации и развития общих и специальных терминов, применяемых в области биомедицины, остаются актуальными.

Нами был проведен анализ ряда ключевых международных и российских законов и нормативных актов в области биоэтики и биомедицины, а также ряд руководств, рекомендаций, учебников, справочных изданий (глоссариев) и научных статей. Было определено современное состояние российского и международного

законодательства в области биомедицины, и разработан алгоритм формирования понятийного аппарата в области биомедицины. В результате были выделены термины, связанные с биоэтикой и биомедициной, в виде понятий и устойчивых выражений. Был сделан перевод англоязычных терминов с учётом сложившейся практики их применения в научных публикациях, для каждого термина было найдено определение и подготовлена сопроводительная статья. На основании собранного материала было составлено справочное издание — «Справочник международных терминов, применяемых в области биомедицины», содержащий как русско-английскую часть с толкованиями, так и англо-русский терминологический словарь. Данный справочник (глоссарий) может быть использован как при работе со специальной литературой, так и в качестве самостоятельного руководства по биомедицине.

Выполнено в рамках государственно-го задания Московского университета (ЦИТИС АААА-А16-116122810207-1).

ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИМБА ЧЕЛОВЕКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Мария Александровна Суровцева¹, Игорь Алексеевич Исаков², Ольга Владимировна Повещенко¹, Александр Петрович Лыков¹, Ирина Иннокентьевна Ким¹, Евгения Викторовна Янкайте¹, Наталья Анатольевна Бондаренко¹, Наталья Петровна Бгатова¹, Александр Николаевич Трунов², Валерий Вячеславович Черных²

¹ НИИКЭЛ — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия;

mfelde@ngs.ru

Лимб является нишей стволовых клеток роговицы и содержит как эпителиальные (LESCs), так и стромальные стволовые клетки (CSCCs). Поиск новых оптимальных условий выделения и культивирования стволовых клеток лимба является базой для создания новых клеточных продуктов, используемых в лечении дефицита лимбальных стволовых клеток.

Цель работы: характеристика стволовых клеток лимба при различных методах выделения и культивирования. Лимбальные стволовые клетки получали из области лимба энуклеированных по плановым медицинским показаниям глаз. Лимбальный графт отмывали, измельчали. Выделение клеток производили двумя методами: ферментативным и эксплантом. При ферментативном методе выделения клеток, лимб обрабатывали 0,05% раствором коллагеназы. Клетки культивировали в стандартных условиях в полной среде DMEM/F12. После третьего пассажа проводили фенотипирование клеток и дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях. При выделении клеток лимба методом экспланта в качестве фидера использовали силиковысушенную амниотическую мембрану (AM). Фрагменты лимба на AM культивировали в стандартных условиях в полной среде CECBM (Corneal Epithelial Cell Basal Medium). После закрытия большей части поверхности AM, адгезированные клетки снимали и фенотипировали. Морфологию клеток оценивали

с помощью микроскопов Axio Observer и электронного. Фенотип клеток определяли на проточном цитофлуориметре. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «Statistica 10,0». Полученная ферментативным методом культура первые сутки отличалась гетерогенностью клеток. К 2–3 пассажу культура была представлена, преимущественно, фибробластоподобными клетками. Данные клетки обладали способностью к цитодифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях, большинство клеток экспрессировали маркеры MMCK (CD90⁺/CD73⁺/CD105⁺/CD34⁻/CD45⁻) и меньшее количество — маркеры эпителиальных клеток. При выделении клеток методом экспланта на 3–5 сутки были отмечены очаги миграции клеток. Клетки первичной культуры имели эпителиоподобную форму, хорошо адгезировались к поверхности AM, экспрессировали маркеры эпителиальных клеток (CK19⁺/p63 α ⁺/ABCG₂⁺) и не несли маркеров MMCK. По данным электронной микроскопии клетки формировали 4–5 слоев на поверхности AM. Таким образом, на основании морфологии клеток, результатов фенотипирования и цитодифференцировки, можно сделать заключение, что клетки, выделенные ферментативным методом, являются преимущественно CSSCs, а методом экспланта — LSCs.

СТРАТЕГИЧЕСКИЕ И ТАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ РАЗРАБОТКИ, ПРОИЗВОДСТВА, МАРКЕТИНГА И ПРИМЕНЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ В РОССИИ

Юрий Владимирович Суханов¹, Павел Михайлович Соколов², Игорь Михайлович Абашин³

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² ЗАО Акрус, Москва, Россия;

³ ООО Акрус БиоМед, Москва, Россия

yuri.sukhanov@gmail.com

Выбор актуальных для медицины и имеющих в то же время рыночный потенциал биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для потенциального производителя представляет серьезную проблему. В медицинском и социальном аспекте, наиболее интересны БМКП для лечения онкологических заболеваний (доля в общем числе клинических исследований клеточных продуктов почти 50%), сердечно-сосудистых заболеваний (11%), критических состояний (9%), дисфункций ЦНС (8%), коррекции диабета (5%) и восстановления кожных покровов (5%). Однако нужно принимать во внимание и реализуемость, достаточную технологическую зрелость разработок — в этом отношении показателем перечень разрешенных для клинического применения клеточных продуктов: половина из них предназначена для лечения повреждений кожных покровов и для применения в травматологии и ортопедии. Хотя рынок средств лечения хронических ран (в т.ч. ожогов) достаточно развит и насыщен, он достаточно динамичен. Консорциум в составе ИБР РАН им. Н.К. Кольцова, МГУ им. М.И. Ломоносова, ПИМУ и ЗАО Акрус с 2017 года осуществляют проект создания промышленного производства БМКП. За два с небольшим года проведены доклинические исследования двух эквивалентов кожи, разработана все технологическая, медицинская и нормативная документация, необходимая для подачи заявления на государственную регистрацию, спроектирована и строится производственная площадка, проведена подготовка к началу

КИ 1 и 2 фаз. Доклинические исследования, проведенные в полном объеме, требуемом 180 ФЗ и «ГТР», обнаружили, вместе с тем, при хороших результатах, проблемы, связанные с неполной адекватностью моделирования заболеваний на животных, принципами «дозирования» БМКП. Основным вопросом при разработке протокола КИ БМКП является вопрос о выборе «препарата сравнения» и сопряжения дизайна с доклиническими исследованиями. Основным риском КИ является не получение доказательств значительно большей эффективности БМКП, при экономической приемлемости вероятной разницы в цене. Важным аспектом является и организация логистики таким образом, чтобы такой недостаток БМКП, как короткий срок годности, компенсировался его эффективностью, простотой применения, большими безопасностью и комфортом для пациента.

В рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития но-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по теме «Разработка технологии производства, хранения и применения биомедицинских клеточных продуктов для лечения ран» СОГЛАСЕНИЕ № 14.610.21.0012 УИР RFMEFI61017X0012.

ТЕЛОЦИТЫ — ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Татьяна Владимировна Сухачева¹, Наталья Викторовна Низяева², Мария Викторовна Самсонова³, Андрей Львович Черняев³, Александр Иванович Щеголев², Роман Андреевич Серов¹

¹ ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Россия;

² ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ФГБУ «НИИ Пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия

tatiana@box.ru

Телоциты (ТЦ) — интерстициальные стволовые клетки мезенхимального происхождения, характерным морфологическим признаком которых являются тонкие протяженные отростки.

Цель исследования: выявить ТЦ в миокарде желудочков детей, определить их ультраструктурные и иммуногистохимические особенности.

Материалы и методы. На ультраструктурном уровне проанализированы биоптаты миокарда правого желудочка 42 детей с тетрадой Фалло (3–33 мес.). Содержание ТЦ определено на ультратонких срезах (×4800) с использованием полуквантитативной 6-балльной шкалы. Для иммуногистохимического исследования использованы моноклональные антитела к С-kit, CD34, CD44, виментину. Выявлены маркеры пролиферации и кардиомиогенной дифференцировки Ki67 и саркомерный α -актин. Результаты проанализированы с использованием методов непараметрической статистики (коэффициент Спирмена).

Результаты. ТЦ миокарда детей формируют сеть вокруг кардиомиоцитов, мелких и крупных интрамуральных сосудов, нервных волокон. Диаметр ТЦ на уровне ядра составляет 1,2–5,0 мкм, диаметр отростков ТЦ — около 0,1 мкм с локальными расширениями до 0,21–1,17 мкм.

Ядро ТЦ окружает небольшой слой цитоплазмы, в которой располагаются цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии, структуры аппарата Гольджи, лизосомы, промежуточные филаменты, центриоли, что свидетельствуют о синтетической и пролиферативной активности этих клеток. Обнаружены контакты отростков ТЦ с макрофагами и стволовыми клетками миокарда. ТЦ осуществляют паракринное воздействие на окружающие их клетки. Содержание ТЦ больше в незрелом миокарде желудочков с незавершенной сборкой миофибрилл в кардиомиоцитах ($r=0,39$; $p=0,014$), где в интерстициальном пространстве сохранена пролиферативная активность мелких $Ki67^+/\alpha\text{-Sarc actin}^+$ клеток-предшественниц кардиомиоцитов ($r=0,39$; $p=0,026$). ТЦ демонстрируют иммуногистохимические признаки стволовых клеток ($C-kit^+$), гематопозитических стволовых клеток ($CD34^+$), соединительно-тканых клеток (виментин⁺) и гематопозитических, фибробластных и глиальных клеток ($CD44^+$). Поскольку ни один из антигенов не является специфическим, для идентификации ТЦ на гистологическом уровне необходимо учитывать форму и размеры клеток, их локализацию в интерстициальном пространстве.

Локализация и ультраструктурные характеристики ТЦ предполагают их участие в дифференцировке стволовых клеток, неоангиогенезе и координации деятельности всех компонентов интерстиция.

КЛЕТКИ НЕОКОРТЕКСА, ПОМЕЩЕННЫЕ В ЖЕЛАТИНОВЫЙ ГИДРОГЕЛЕВЫЙ КОНДУИТ, СТИМУЛИРУЮТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА

Кирилл Константинович Сухинич¹, Эрдэм Баирович Дашинимаев^{1,2}, Екатерина Андреевна Воротеяк¹⁻³, Мария Анатольевна Александрова^{1,3}

¹ Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;

³ ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова Москва, Россия

transpl@hotmail.com

Травмы периферических нервов широко распространены и могут приводить к длительной потере трудоспособности с высокой частотой инвалидизации. Методы микрохирургии позволяют восстановить нерв при повреждениях небольшой протяженности. При значительных повреждениях применяется трансплантация аутологических нервов, требующая хирургического вмешательства, часто приводящего к потере чувствительности тканей, а также к осложнениям из-за образования рубца и дегенерации пересаженного нерва. В связи с этим, необходим поиск альтернативных подходов, в частности, таких как клеточная терапия в сочетании с биоинженерными конструкциями для соединения поврежденного нерва (кондуитов). В данной работе, для соединения перерезанного периферического нерва, разработали кондуит из желатинового гидрогеля, в который помещали клетки коры и спинного мозга эмбрионов мышей.

В экспериментах использовали мышей C57Bl/6 и трансгенных мышей C57Bl/6-Tg (ACTB-EGFP) 10sb/J (JacksonLaboratories, BarHarbor, Maine, USA).

В кондуиты из желатинового гидрогеля, соединяющие перерезанный нерв, инъецировали фрагменты коры или спинного мозга от эмбрионов Э19.5 и Э14.5 EGFP мышей. Через 2, 5 и 8 недель после операции оценивали восстановление двигательной функции с помощью интегрального показателя функции седалищного нерва (Sciatic function index, SFI), затем проводили гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование.

Через 8 недель после операции гистологическое исследование выявило, что выжили только клетки коры, но не клетки спинного мозга. ИГХ исследование показало, что некоторые клетки были положительны к нейрональным маркерам NF и NeuN, остальные дифференцировались в глиальном направлении и были положительны к GFAP и S100 β . Анализ функционального восстановления не показал значимых различий на сроках 2 и 5 недель после операции, однако через 8 недель была зафиксирована достоверная разница между группой с кортикальным трансплантатом и контрольной группой.

Таким образом, желатиновый гидрогелевый кондуит, заполненный клетками фетального неокортекса, которые успешно выживают и дифференцируются, является адекватной биоинженерной конструкцией для регенерации и функционального восстановления поврежденного периферического нерва.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБР РАН и программы Президиума РАН «Инновационные разработки в биомедицине», проект «Разработка новой биомедицинской технологии лечения травмы периферических нервов».

СОЗДАНИЕ КСЕНОГРАФТНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ МЫШАХ

Лейсан Газинуровна Тазетдинова, Светлана Сергеевна Архипова, Светлана Анатольевна Софронова, Айсылу Илдаровна Муллагулова, Михаил Олегович Мавликеев, Валерия Владимировна Соловьева, Альберт Анатольевич Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

safinaleys@gmail.com

Микроокружение опухоли представляет собой динамическую среду, состоящую из различных типов клеток, в том числе и мезенхимных стволовых клеток (МСК). Животные модели ксенографтов опухолей имеют важное значение при исследовании процессов онкогенеза в условиях *in vivo*. Однако использование иммунодефицитных мышей ограничены в своей информативности из-за отсутствия иммунной системы у животных. Важное значение для роста и формирования опухоли оказывают клетки иммунной системы и МСК. Целью нашей работы являлось создание ксенографтной модели опухоли в теле иммунокомпетентной мыши путем подкожного введения генетически модифицированных клеток нейробластомы человека, экспрессирующих биолюминесцентный белок люциферазы светлячка (SH-SY5Y-ffLuc). Полученные опухолевые модели будут использоваться для дальнейших исследований процессов онкогенеза и определения влияния МСК на опухолевый рост.

Генетическую модификацию SH-SY5Y проводили с помощью рекомбинантного лентивируса LV-ffLuc. Для получения стабильной линии SH-SY5Y-ffLuc клетки

культивировали в присутствии селективного антибиотика пуромицина (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл, концентрация антибиотика определяли заранее с помощью MTS-теста в различных концентрациях. Анализ биолюминесценции *in vitro* оценивали добавлением к клеткам субстрата ONE-Glo™ Luciferase Assay System. Было отмечено, что SH-SY5Y-ffLuc сохраняли биолюминесцентные свойства в течение длительного периода времени. Ксенографтную модель получали путем подкожной инъекции SH-SY5Y-ffLuc (3×10^6) в 300 мкл суспензии Matrigel Matrix (1:1) 6-недельным самцам мышей C57BL/6. Для *in vivo* визуализации через сутки и 30 дней после введения SH-SY5Y-ffLuc, животным вводили внутривенно D-люциферин, растворенный в фосфатно-солевом буфере, в дозе 150 мг/кг. Изображения получали спустя 3 мин после введения субстрата серийно, каждые 10 мин., в течение 30 мин., в ходе которой была отмечена стабильная биолюминесценция.

Таким образом, подкожная ксенотрансплантация опухолевых клеток нейробластомы человека иммунокомпетентной мыши является удачной. Полученные нами данные могут способствовать дальнейшим исследованиями в отношении разработки ксенографтной модели и использоваться для разработки системы скрининга при тестировании новых противоопухолевых средств.

Работа финансировалась грантом РФФИ № 18-34-00738.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОБМОРОЖЕНИЙ, ОЖОГОВ И РАНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АРКТИКИ

**Андрей Александрович Темнов, Станислав
Анатолевич Бирюков, Глеб Игоревич Фильков,
Ангелина Владимировна Потапова, Александр
Валерьевич Лисин, Елена Владимировна
Горина, Валерий Владимирович Бояринцев,
Александр Викторович Трофименко**

*Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет),
Москва, Россия*

aa-temnov@yandex.ru

Обморожения являются одними из наиболее часто встречающихся типов травм в условиях холодного климата. Важнейшим повреждающим фактором при криотравме является синдром ишемии-реперфузии. Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) является патологическим процессом, когда повреждение клеток обмороженного органа усиливается после восстановления кровотока к нему. Одной из наиболее привлекательных потенциальных стратегий лечения ИРП является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Поскольку МСК широко используются для лечения патологий, связанных с синдромом ишемии-реперфузии, то, согласно нашей гипотезе, они могут помочь и при лечении обморожений, т. к. основную повреждающую роль при криотравме играет именно этот синдром.

В данной работе мы разработали протокол получения аллогенных МСК из красного костного мозга мыши и крысы, а также оценили их фенотип и выбрали оптимальные условия культивирования в условиях гипоксии. Как для мышиных, так и для крысиных популяций МСК, было показано методом проточной цитометрии, что более 95% МСК экспрессируют CD105 и CD73. При этом

популяция практически не содержит CD45 и CD34-позитивных клеток (<1%).

На следующем этапе мы оценили влияние условий культивирования МСК при гипоксии (5% кислорода в атмосфере) и нормоксии (при 20% кислорода) на скорость их пролиферации. Для этого мы сравнили полученные с помощью цитометрии профили содержания ДНК в МСК, культивируемых в стандартных условиях, и после их помещения в атмосферу с пониженным содержанием кислорода. Было обнаружено, что при переходе из нормоксии в гипоксию происходило небольшое, но достоверное увеличение числа клеток, находящихся в S и G₂/M стадиях клеточного цикла, т. е. находящихся в процессе удвоения. Это говорит о том, что атмосфера с пониженным содержанием кислорода является оптимальной для роста МСК. Этот вывод подтвердился результатами эксперимента с колониеобразованием.

Таким образом, разработанные протоколы позволили получить чистые популяции МСК из костного мозга мыши и крысы и поддерживать повышенную пролиферативную активность на протяжении нескольких пассажей, что является необходимым условием биомедицинского применения МСК для лечения различных патологий, включая ИРП при холодовой травме.

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидии по соглашению от 28 ноября 2018 года № 14.575.21.0179 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518XO179), заключенное между Министерством науки и высшего образования РФ и Московским физико-техническим институтом.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ, МЕХАНИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

**Тимур Хасянович Тенчурин¹, Алексей
Дмиртриевич Шепелев¹, Елена Вячеславовна
Сытина¹, Елена Викторовна Истранова²,
Виссарион Георгиевич Мамагулашвили¹,
Сергей Владимирович Крашенинников¹, Роман
Андреевич Камышинский¹, Елизавета Васильевна
Нестеренко¹, Сергей Николаевич Чвалун¹**

¹ НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия;

² Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

tenchurin.timur@mail.ru

Создание трехмерных структур, наделенных биоподобными свойствами, представляет значительный интерес для регенеративной медицины. Поведение клетки в организме определяется химическими и морфологическими особенностями окружающей ее трехмерной сетки внеклеточного матрикса (ВКМ). Одним из типов ВКМ являются базальные мембраны (БМ). БМ обладают нановолокнистой структурой с размером пор от 33 до 131 нм и диаметром волокон от 24 до 80 нм. Наиболее перспективным методом создания биомиметической структуры, подобной БМ, является электроформование. Методом электроформования из растворов коллагена в гексафторизопропанол и уксусной кислоты при добавлении волокнообразующей добавки ПЭО (полиэтиленоксид) с различной молекулярной массой 1000–5000 кДа (концентрацией 0,4–1,7%), получены нетканые материалы с диаметром волокон от 100 нм до 3 мкм. Исследования методом кругового дихроизма и дифференциальной сканирующей

калориметрии свидетельствуют о преимущественном сохранении тройной спирали коллагена в изготовленных материалах. Для сохранения волокнистой структуры коллагена в водных средах проведена его сшивка генипином в среде изопропиловый спирт: фосфатный буфер в отношении 75:25 при концентрации генипина 1, 0,1 и 0,01%. Проведено сравнение механического поведения сшитых коллагеновых материалов в физиологическом диапазоне нагрузок с некоторыми типами нативных тканей. Сшитые волокнистые материалы не обладают цитотоксичностью, способствуют адгезии и пролиферации клеток. Фибробласты активно распространяются по поверхности всех протестированных материалов. Полученные результаты показали, что заселение клетками материалов на основе коллагена происходит интенсивнее, чем материалов, полученных из денатурированного коллагена (желатина) и коллаген-желатиновой смеси.

Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства города Москвы, грант РФФИ 19-33-70071 мол_а_мос.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНОГО ЭФФЕКТА СОЧЕТАНИЯ РОСТ-ФАКТОРОВ BMP-2, PDGF И VEGF В МАТЕРИАЛЕ НА ОСНОВЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА

Полина Олеговна Теплова^{1,2}, Анатолий Сергеевич Сенотов¹, Ирина Сергеевна Фадеева¹, Алёна Игоревна Звягина¹, Владислав Валентинович Минайчев¹, Анастасия Юрьевна Тетерина³, Владимир Семёнович Акатов¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

² ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

³ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

p.o.teplova@gmail.com

В процессе репарации костной травмы ключевое влияние оказывают проинфламаторные, ангиогенные и остеогенные ростовые факторы, обеспечивающие адгезию, пролиферацию, а также дифференцировку клеток-предшественников в остеобластный фенотип. Актуальной проблемой регенеративной медицины является изучение координированной работы этих рост-факторов в месте повреждения костной ткани, т.к. любое нарушение баланса молекулярного сигналинга может привести к множественным осложнениям, несращению перелома и последующей инвалидизации пациентов.

Целью работы являлось *in vitro* и *in vivo* исследование остеоиндуктивного действия комбинации рекомбинантных цитокинов BMP-2 (1 мкг/мл), PDGF (100 нг/мл) и VEGF (100 нг/мл). В качестве остеокондуктора использовался авторский материал на основе деминерализованного костного матрикса (ДКМ). Комплексный гистологический, спектроскопический анализ и биоимиджинг образцов (Nikon Eclipse Ti-E, ПО NIS-Elements; TCS SP5, Leica MS) выполняли через 45 сут. подкожной имплантации крысам стока Wistar. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями ISO 10993 и одобрены этическим комитетом ИТЭБ РАН.

Было обнаружено, что несмотря на дозозависимое увеличение активности щелочной фосфатазы *in vitro*,

использование VEGF как в монорежиме, так и в сочетании с BMP-2 и (или) PDGF *in vivo* на ранних сроках регенерации крайне нежелательно, т.к. вызывает воспаление, стремительную резорбцию остеокондуктора и подавление неоколлагенеза. BMP-2 и PDGF по отдельности демонстрировали положительные результаты по таким параметрам, как синтез и структуризация коллагена *de novo*, неоваскуляризация и физиологическая минерализация ДКМ, однако использование комбинации цитокинов BMP-2 и PDGF в модели подкожной имплантации обеспечивало наиболее выраженный остеоиндуктивный эффект, выражающийся в интенсивной репопуляции, активном образовании неоколлагеновых трабекулоподобных структур и их физиологической остеогенной минерализации не только ДКМ, но и новообразованного матрикса. В докладе подробнее обсуждаются использованные подходы и результаты.

Таким образом, можно заключить, что комбинация BMP-2 с PDGF в материалах на основе ДКМ является наиболее эффективной и может быть рекомендована для дальнейшего изучения в области реконструктивной хирургии костной ткани в модели ортотопической имплантации.

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН и поддержана Фондом содействия инновациям и Советом по грантам Президента РФ(СП-1275.2019.4).

ИНДУКЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ IL-10

Валерий Павлович Терещенко^{1,2}, Юлия Николаевна Хантакова^{1,2}, Василий Васильевич Курилин^{1,2}, Александр Николаевич Силков¹, Юлия Александровна Шевченко^{1,2}, Юлия Анатольевна Лопатникова¹, Амир Закиевич Максютлов³, Сергей Витальевич Сенников^{1,2}

¹ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ НЦ Вирусологии и биотехнологии Вектор, Кольцово, Россия

tervp@ngs.ru

Одним из перспективных экспериментальных подходов в клеточной терапии трансплантационных реакций, таких как реакция отторжения и реакция трансплантат против хозяина, считается применение толерогенных дендритных клеток (ДК) и получаемых с их помощью Treg и Tr1 клеток.

В данной работе для получения FoxP3⁺ Treg клеток и IL-10⁺ Tr1 с целью разработки экспериментального подхода для угнетения трансплантационных реакций использовали ДК, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10

Толерогенные ДК получали из костного мозга мышей C57Bl/6 в присутствии GM-CSF и IL-4 в течение 3 дней. Для стабилизации толерогенных свойств и усиления толерогенной функции ДК трансфицировали методом электропорации плазмидной ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10. Полученные дендритные клетки проверяли на способность к индукции FoxP3⁺ Treg и IL-10⁺ Tr1 клеток при сокультивировании с аутологичными спленоцитами.

Дендритные клетки, полученные из костного мозга мышей C57Bl/6 в присутствии GM-CSF и IL-4 по 3х

дневному протоколу, согласно экспрессии H2-b, CD80 и CD86, обладали незрелым фенотипом.

Далее ДК трансфицировали методом электропорации ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10. Эффективность электропорации была проверена методом ИФА, с помощью которого было показано, что при увеличении количества плазмидной ДНК, используемой для трансфекции увеличивалось и количество IL-10 в кондиционных средах от трансфицированных ДК. Таким образом, трансфекция ДК методом электропорации протекала успешно.

ДК, подвергнутые электропорации, согласно экспрессии CD80, CD86, CD83 и CD40 обладали более зрелым фенотипом по сравнению с незлектропорированными клетками. При этом электропорация ДК именно IL-10 несколько снижала эффект созревания по сравнению с электропорацией контрольной плазмидой.

ДК, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10, были способны увеличивать относительное количество FoxP3⁺ Treg и IL-10⁺ Tr1 клеток в культурах аутологичных спленоцитов, по сравнению со спленоцитами, нестимулированными ДК и по сравнению со спленоцитами, стимулированными ДК, трансфицированными контрольной плазмидой, что говорило о их способности выполнять толерогенную функцию.

Таким образом, ДК, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10, приводят к индукции Treg и Tr1 клеток и могут быть рекомендованы для дальнейших *in vivo* экспериментов с целью разработки подходов угнетения трансплантационных реакций.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00086).

ЦИФРОВАЯ МОРФОМЕТРИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ — КАК МОДЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕЙСТВИЯ СЛАБЫХ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VIVO*

Харлампий Пантелеевич Тирас^{1,2}, Александр Николаевич Яворский¹, Александр Александрович Деев², Светлана Евгеньевна Нефедова^{1,2}

¹ Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

tiras1950@yandex.ru

Работа посвящена актуальной проблеме биологии развития — управлению процессами регенерации химическими и физическими факторами на примере регенерации плоских червей — планарий, опирающаяся на цифровые технологии работы с живыми объектами.

Планарии являются классическим объектом для изучения процесса посттравматической регенерации, они способны восстанавливать любую часть тела, включая головной ганглий. Биотестирование проводится на модели регенерации головной части тела после декапитации методом прижизненной цифровой морфометрии (ПЦМ) с использованием программы Plana 5.0 через 72, 96 и 120 часов после перерезки на одной и той же группе планарий.

Метод ПЦМ базируется на регистрации фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (непокрытыми пигментом) частями тела регенерирующих планарий. Для получения изображений планарий применяется бинокулярный цифровой микроскоп Stemi 2000C (Zeiss). Определяется площадь проекции

тела регенеранта и его бласты в программе Plana 5.0 путем полуавтоматического оконтуривания всего периметра ее тела.

Была изучена роль различных нейропептидов в процессе регенерации в диапазоне 10^{-7} – 10^{-15} М. Сравнение действия нейропептидов на регенерацию планарий выявило: стимуляцию, торможение, а также отсутствие эффекта. Стимуляторами регенерации планарий являются даларгин, аргинил-вазопрессин, пептидный морфоген гидры и соматостатин. Ингибитор регенерации — люлиберин действовал в концентрациях до 10^{-15} М. Пептид — стимулятор роста растений также стимулировал регенерацию планарий в концентрациях до 10^{-12} М. Тем самым, был показан универсальный характер пептидной регуляции регенерации животных и растений.

Физические факторы — регуляторы регенерации. В наших исследованиях была выявлена чувствительность процесса регенерации к действию миллиметрового излучения, а также слабых и сверхслабых электромагнитных полей в диапазоне от 50 мкТ до 100 наноТ. Было показано, что слабые комбинированные магнитные поля (КМП), настроенные на резонанс к ионам Са и К, способны регулировать регенерацию планарий.

Совместное действие химических и физических факторов. Было показано, аддитивное действие химических и физических факторов на регенерацию. Эффекты серотонина, мелатонина и ретиноевой кислоты на процесс регенерации, могут быть усилены или ослаблены действием разнонаправленных слабых КМП.

Разработанный метод динамической цифровой морфометрии позволяет объективно оценить влияние физических и химических факторов на процесс регенерации у планарий

ПРИМЕНЕНИЕ 3D БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛОЙ ЧМТ

Ольга Павловна Тихобразова¹, Мария Сергеевна Муравева¹, Евгений Александрович Ключев¹, Ольга Сергеевна Баскина¹, Ирина Васильевна Мухина^{1,2}

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

² Институт биологии и биомедицины,

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

olga.tikhobrazova@gmail.com

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. 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 трансплантация нейральных клеток на основе 3D носителей из 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. 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. Однако клинические и экспериментальные эффекты трансплантации таких носителей, создающих подходящую для регенерации тканей и нейротрансплантации среду, изучены недостаточно. В представленной работе на модели открытой тяжелой ЧМТ мозга мышью линии C57BL/6 изучена способность 3D биодеградируемого скаффолда к восстановлению функций головного мозга. В качестве скаффолда использовали многофункциональные гидрогелевые матриксы на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, выполняющие роль носителя трансплантируемых клеток и замещающего матрикс нервной ткани при проведении реконструктивной терапии. Трансплантация скаффолда в очаг повреждения через 7 суток после ЧМТ оказывала протекторное действия, уменьшая нарушения неврологических и двигательных функций животных. Наблюдалось оптимизирующее действие на способность животных к восстановлению функций гиппокампа зависимой кратковременной памяти, а также способствовало актуализации следов долговременной памяти в отдаленном посттравматическом периоде. Анализ гистологических исследований и высокопольной МРТ показал достоверное уменьшение объема очага повреждения. Поддержание объема мозга в посттравматическом периоде за счет трансплантации скаффолда в течение первого месяца, предупреждало нарушение работы нейронных сетей мозга, что обуславливает лучшее восстановление когнитивных и рефлекторных функций ЦНС в отдаленном посттравматическом периоде.

УПРУГИЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ СО СЛОЖНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Андрей Александрович Тихонов¹, Елена Сергеевна Климашина^{1,2}, Павел Владимирович Евдокимов^{1,2}, Валерий Иванович Путляев^{1,2}, Георгий Александрович Шипунов³, Иван Михайлович Щербakov³, Вадим Эрикович Дубров³, Наталья Владимировна Данилова³, Павел Георгиевич Мальков³

¹ Факультет наук о материалах, МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

andytikhon94@gmail.com

В работе рассмотрены аспекты создания материалов для костной имплантации на основе деградируемых гидрогелей и фосфатов кальция с помощью 3D-печати. Подобная формулировка состава разрабатываемых биоматериалов обусловлена нативной костной тканью, которая содержит как органическую компоненту (коллаген), обеспечивающую упругость костей, так и неорганическую составляющую (фосфаты кальция, преимущественно представленные гидроксипатитом ГАП), придающую костям необходимые прочностные характеристики.

В качестве аналога коллагена нами предложены гидрогели на основе акрилатных производных полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые обладают свойствами

биосовместимости, биорезорбируемости, упругости и способности к набуханию в различных средах. Они могут быть получены в результате реакций радикальной фотополимеризации, лежащей в основе стереолитографической 3D-печати. Метод 3D-печати в настоящее время практически безальтернативно позволяет решить вопросы персонализированного подхода во время лечения и создания osteoconductive материалов сложной пористой архитектуры с оптимальным соотношением проницаемости и прочности/упругости.

Для замены биорезистивного ГАП были предложены высокорезорбируемые слоистые фосфаты кальция (брушит и октакальциевый фосфат), которые способны армировать гидрогелевые каркасы за счет пластинчатой морфологии частиц, а также доставлять физиологически активные белки в зону дефекта.

Полученные в ходе работы биоконструкты гидрогель/фосфат кальция были охарактеризованы рядом физико-химических, механических и медико-биологических исследований, и могут быть рекомендованы для дальнейших клинических испытаний по замещению сложных костных дефектов человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 17-79-20427 с использованием оборудования, приобретенного за счет Программы развития Московского университета.

УЛЬТРАПОРИСТЫЕ КЕРАМИЧЕСКИЕ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ СО СЛОЖНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Снежана Алексеевна Тихонова¹, Павел Владимирович Евдокимов^{1,2}, Екатерина Сергеевна Новоселецкая³, Анастасия Юрьевна Ефименко³, Валерий Иванович Путляев^{1,2}

¹ Факультет наук о материалах, МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kurbatova.snezhana@yandex.ru

На данный момент наиболее перспективным направлением в костной имплантации является регенеративный подход. В рамках данного подхода предполагается создание так называемых конструкций тканевой инженерии, которые обеспечивают и поддерживают рост и регенерацию естественной костной ткани самим организмом в процессе заживления дефекта. Наиболее перспективны в данном направлении биорезорбируемые керамические материалы на основе фосфатов кальция (например, на основе трикальций-фосфата ТКФ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). В то же время современная концепция биоимплантата подразумевает под собой не только биосовместимость и биорезорбируемость материала, но и наличие у него osteoconductive свойств. Osteoconductive — это способность материала создавать условия для прорастания новообразующейся костной ткани, кровеносных сосудов и нервных волокон в объем имплантата, обеспечивать протекание необходимых биологических жидкостей а также прикрепление и дифференцировку клеток.

Понятие osteoconductive определяется проницаемостью, которая необходима для прорастания нативной кости и проникновения биологических жидкостей в объем имплантата; площадью поверхности — влияет

на скорость резорбции и остеогенеза; и шероховатостью поверхности, которая необходима для обеспечения адгезии и пролиферации костеобразующих клеток.

В данной работе рассматривается следующий подход к повышению остеокондуктивных свойств материала: создание конструкций (скаффолдов) определенной архитектуры с мультимодальным распределением пор, как минимумом трёх уровней: 1) первая мода — система пор с каналами диаметром более 500 мкм (доля не менее 70% объёма); 2) вторая мода — система пор в каркасе образца с диаметром от 50 до 200 мкм (доля не менее 15% объёма); 3) третья мода — поры с диаметром менее 10 мкм (доля не менее 2% объёма). Таким образом готовое изделие должно обладать пористостью не менее 87%, что позволяет назвать такой материал ультрапористым. Первая мода пор задаётся путём стереолитографической 3D-печати; вторая — методом удаляемых добавок; третья образуется в результате неполного спекания керамического каркаса материала.

Ультрапористые керамические материалы на основе трикальцийфосфата, полученные в рамках данной работы, биосовместимы, демонстрируют высокую остеокондуктивность, достаточную прочность и способность к резорбции и могут применяться в качестве основы для конструкций тканевой инженерии в костной имплантации.

Работа выполнена при поддержке гранта № 18-79-00256 Российского Научного Фонда.

МАГНИТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Снежана Алексеевна Тихонова¹, Валерий Иванович Путляев^{1,2}, Павел Владимирович Евдокимов^{1,2}, Татьяна Викторовна Сафронова², Андрей Александрович Тихонов¹, Николай Константинович Орлов¹, Алексей Викторович Гаршев^{1,2}, Елена Сергеевна Климашина², Ярослав Юрьевич Филиппов^{1,3}, Иван Михайлович Щербачев⁴, Вадим Эрикович Дубров⁴

¹ Факультет наук о материалах, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ НИИ механики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kurbatova.snezhana@yandex.ru

Историческое развитие биоматериалов для костной имплантации протекало через переход от биоинертных материалов, целью которых было лишь замещение поврежденного участка кости, к биоактивным керамическим материалам на основе фосфатов кальция, которые постепенно деградируют во внутренней среде организма, замещаясь новообразующейся костной тканью.

Сейчас большинство исследований ведутся по разработке так называемых конструкций тканевой инженерии — материалов определенного состава и со специальной архитектурой, способных стимулировать биологический отклик со стороны организма, регенерацию кости, прорастание кровеносных сосудов и нервных волокон в имплантат. Помимо этого начинают появляться публикации, демонстрирующие возможность

создания материалов, управляемых внешним полем воздействием, «умных» материалов. В них под каким-либо внешним воздействием происходит специфический отклик, что позволяет стимулировать остеогенез и регенерацию костной ткани.

С точки зрения лучшей «совместимости» с организмом человека наиболее интересно воздействие внешнего магнитного поля. Применение материалов с магнитоэлектрическими свойствами (мультиферроиков) позволяет за счет внешнего магнитного воздействия индуцировать возникновение в области дефекта локального электрического поля, которое и ускоряет процесс остеобразования.

Целью работы является разработка композитных имплантатов, активируемых внешним магнитным полем. Помимо основного требования биосовместимости в материале должны быть учтены следующие положения.

Матрикс материала должен обеспечивать его деградацию в организме; он может быть либо керамическим (наиболее перспективными считаются резорбируемые фосфаты кальция, такие как, например, трикальцийфосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), либо полимерным (гидрофильные полимеры (гидрогели)).

В качестве магнитоактивного компонента, исходя из требований максимальной эффективности и минимальной цитотоксичности, предложено использовать соединение-мультиферроик феррит висмута BiFeO_3 , а также композитные мультиферроики, представляющие собой магнитоэластик (феррит кобальта CoFe_2O_4) и пьезоэлектрик (титанат бария BaTiO_3 , натрий-калиевый ниобат $\text{Na}_{0.5}\text{K}_{0.5}\text{NbO}_3$), приведенные в плотный механический контакт.

Материалы, полученные в рамках данной работы, обладают улучшенными остеокондуктивными свойствами и могут рассматриваться как материалы нового (пятого) поколения биоматериалов для костной имплантации.

Работа выполнена при поддержке гранта № 19-19-00587 Российского Научного Фонда.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТочНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Алексей Николаевич Томилин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

a.tomilin@incras.ru

Плюрипотентные стволовые клетки, которым будет посвящен доклад, 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 — трофобласты и первичной эндодермы). В докладе будет освещена история развития данного направления биологии, приведены результаты современных достижений в области плюрипотентных стволовых клеток. В докладе будет также затронута важная тема, касающаяся приложения фундаментальных знаний о плюрипотентных стволовых клетках в практической медицине.

Проекты, представленные в докладе, были поддержаны грантами РФФИ № 17-14-01407, РФФИ № 17-00-00324 и 18-04-01199, Программой Президиума РАН ФИМТ.

ЭЛЕКТРОСПИННИНГ И СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Екатерина Максимовна Трифанова¹, Роман Александрович Акасов², Алла Николаевна Генералова², Александра Олеговна Мариянац¹, Александр Георгиевич Савельев¹, Анастасия Владимировна Сочилина^{1,2}, Евгений Валерьевич Хайдуков¹, Владимир Карпович Попов¹

¹ ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

katikin@mail.ru

Тканеинженерные конструкции на основе коллагена активно используются сегодня в биомедицинских исследованиях. Однако, эффективность их применения ограничена недостаточно высокими физико-механическими характеристиками и структурной стабильностью в культуральных средах и живом организме. Для улучшения физико-химических свойств коллагеновых матриксов могут применяться различные сшивающие агенты, такие как генипин, глутаровый альдегид и другие. При этом, генипин являясь природным сшивающим агентом, обладает заметно более низкой (по сравнению с другими соединениями) токсичностью, что и делает его весьма перспективным для решения этой проблемы.

Цель работы: формирование высокопористых коллагеновых пленочных матриксов методом электроспиннинга, их стабилизация с использованием генипина и тестирование в культуре фибробластов *in vitro*. Для этого коллаген смешивался с гексафторизопропанолом и генипином. Готовые матриксы выдерживали в 0,03 М генипина в этаноле в течение 3, 6 и 14 суток при 37°C, после чего их промывали в фосфатно-соляном буферном растворе в течение суток. Анализ матриксов методом сканирующей электронной микроскопии показало, что все исследованные образцы сохранили свою волокнистую микроструктуру. По данным механических испытаний на растяжение добавление генипина в исходную композицию позволило увеличить механическую прочность образцов более, чем на порядок.

Для *in vitro* исследований матриксы помещали в лунки 24-луночного планшета, покрытые агарозой. Суспензию человеческих фибробластов Vj-5та добавляли к матриксам, после чего их инкубировали в течение 14 дней. Рост клеток наблюдали с помощью световой микроскопии, пролиферативного теста WST-1 и флуоресцентного окрашивания Кальцеином АМ. Показано отсутствие цитотоксичности всех образцов. Модификация исходной композиции с помощью генипина привела к умеренному повышению эффективности пролиферации клеток по сравнению с контрольными образцами. Конфокальная микроскопия подтвердила выживаемость и равномерное распределение клеток по поверхности матриксов.

Таким образом, нами разработан процесс синтеза коллагеновых пленочных матриксов методом электроспиннинга с последующей структурной стабилизацией генипином. Изучены механические свойства матриксов, их цитотоксичность и цитосовместимость с целью дальнейшего использования в тканевой инженерии.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ РИТМИКИ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ

Ирина Евгеньевна Трубицына, Заира Магомедовна Абдулатипова, Юлия Михайловна Орлова, Галина Григорьевна Варванина

ГБУЗ Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

ie.trubitsyna@gmail.com

Введение. Клетки и межклеточная жидкость это информационно-коммуникационная система (ИКС), образованная сетью связанных между собой микро- и макромолекул. Она принимает участие в формировании высокоспециализированных структур, специализация и молекулярный состав которых зависит от комбинации биологически активных соединений (БАС). Комплекс клетки и межклеточный матрикс существует самостоятельно, являясь саморегулируемой, самовосстанавливающейся физиологической системой. Она инициирует процессы пролиферации и дифференциации в месте повреждения. Поэтому изучение состава и комбинации БАС, позволит раскрыть механизмы процессов пато- и саногенеза.

Цель. Установить динамику изменений концентрации БАС в процессе регенерации поврежденной ткани.

Материал и методы. Использовали 55 белых крыс линии Wistar. У крыс повреждающим химическим методом воспроизводили язву желудка (ЯЖ), толстой кишки (ЯТК) и панкреатита (П). В экстрактах слизистой оболочки и сыворотке крови определяли концентрацию гистамина, серотонина, ацетилхолина, IL-1, IL-4, TNF, IFN. Проводили морфологические исследования.

Результаты и обсуждение. Патогенетические механизмы формирования зоны повреждения имеют свои законы и этапы, которые четко определены комбинацией БАС. Используя экспериментальные исследования, мы смогли проследить соотношение и концентрацию БАС в динамике. С 1сек. Значительно, но кратковременно повышается содержание гистамина (на 420%). Далее серотонина на 370%, одновременно возрастает концентрация IL-1, IFN и TNF. Морфологически: сосудистые нарушения, снижение кровотока при венозной гиперемии, некроз. Далее незначительно снижается концентрация серотонина и провоспалительных цитокинов, повышается концентрация ацетилхолина и IL-4. Любое нарушение динамики этих изменений (временное или количественное) обеспечивает затягивание фазы альтерации и запаздывание фазы пролиферации. Происходит нарушение отклика ИКС на восстановление жизнедеятельности и функциональной активности клеток и начало фазы регенерации.

Заключение. Таким образом, как процессы альтерации так и регенерации имеют «свою» комбинацию БАС в определенные временные периоды. В результате этого происходит дезорганизация процессов пато- и саногенеза поврежденных.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ p38 MAPK НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

Ирина Сергеевна Трухан¹, Наталья Николаевна Дремина¹, Михаил Геннадьевич Шурыгин¹, Ирина Александровна Шурыгина^{1,2}

¹ ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия;

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

shurygina@rambler.ru

Как установлено нами в предыдущих исследованиях, локальная блокада активности p38 MAPK существенно влияет на формирование соединительной ткани в зоне травматического повреждения, снижает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышает фиброкластическую активность.

Цель исследования: определить влияние ингибитора p38 на окислительное фосфорилирование в фибробластах.

Эксперимент проведен на первичной культуре фибробластов, выделенной из сальника крысы линии Wistar. К клеткам 3 пассажа добавляли ингибитор p38 SB 203580 (Tosgris) в различных концентрациях. Проводили прижизненное наблюдение за морфологией клеточной культуры в течение суток при помощи BioStationCT Cell Culture Observation System Ver. 4.1 NIKON. Через сутки клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием первичных антител anti-OxPhos Complex IV subunit I (Invitrogen).

Установлено, что ингибитор SB203580 резко повышал окислительное фосфорилирование в фибробластах, причем наблюдаемый эффект являлся дозозависимым.

АДГЕЗИЯ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА 3D-ПЕЧАТНОМ МАТРИКСЕ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Виктор Васильевич Турчин¹, Максим Витальевич Солопов¹, Дмитрий Васильевич Жихарев⁴, Андрей Геннадиевич Попандопуло¹, Валерий Викторович Бурховецкий², Валентина Александровна Глазунова², Эмиль Яковлевич Фисталь¹, Михаил Сергеевич Кондрусь⁵, Андрей Леонидович Боряк³

¹ Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, Донецк, Украина;

² ГУ «Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина», Донецк, Украина;

³ Республиканский травматологический центр, Донецк, Украина;

⁴ Клиническая Рудничная больница, Макеевка, Украина;

⁵ ООО «ЗД-Техно», Донецк, Украина

turchin.dn@mail.ru

Одним из важных вопросов тканевой инженерии является применение искусственных материалов, в качестве тканевых матриц, обладающих как соответствующими прочностными характеристиками, биосовместимостью, так и биodeградируемостью. Среди подобных материалов поликапролактон (ПКЛ) является одним из наиболее перспективных. ПКЛ может быть использован при изготовлении тканевых матриц различными

методами, такими как электроспиннинг, 3D-печать и др. Данный материал активно применяется для протезирования костной ткани, изготовлении кожных и сосудистых тканевых эквивалентов. В большинстве случаев, для успешного формирования тканевых эквивалентов важна адгезия клеточных компонентов с матричным материалом. В данной работе мы оценивали способность адгезии фетальных фибробластов человека (ФФЧ) к ПКЛ-матриксу, полученному методом 3D-печати, а также оценивали жизнеспособность адгезированных ФФЧ.

ПКЛ-матрикс был получен с помощью 3D-печати методом послойной укладки полимера под разными углами в горизонтальной плоскости. Полученный многослойный блок размером 10×10×25 мм имел ячеистую структуру (толщина нити 150 мкм). На поверхность блока наносили 200 мкл клеточной суспензии в концентрации 1 млн/мл в ростовой среде DMEM/F12 с 10% ФТС и инкубировали в течение 2 ч в CO²-инкубаторе при стандартных условиях. Затем блоки переносили в ростовую среду для дальнейшего культивирования. Чтобы избежать миграции клеток, блоки располагали на вазелиновой подложке. В работе были использованы ФФЧ 5-го пассажа. Жизнеспособность адгезированных ФФЧ оценивали методом с витальным красителем резазурином в течение 4 дней. Срезы образцов для микроскопического исследования окрашивали по методу Гимза. В качестве дополнительного метода визуализации адгезированных к матриксу клеток использовалась сканирующая электронная микроскопия.

Согласно полученным результатам, ФФЧ успешно адгезировали к ПКЛ-матриксу. Уровень жизнеспособности линейно увеличивался, и на 4 день был более чем в 2 раза выше, по сравнению с первым днём культивирования.

В итоге исследования было подтверждено, что ПКЛ является перспективным материалом для использования в тканевой инженерии за счёт адгезивной поверхности и поддержания жизнеспособности клеточных культур человека.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Ольга Владимировна Тюмина, Станислав Евгеньевич Волчков, Павел Анатольевич Овчинников

ГБУЗ СО «МЦ Династия», Самара, Россия

centr123@bk.ru

В 2003 г. в Самаре впервые в РФ был зарегистрирован государственный банк пуповинной крови (ПК) — ГБУЗ «Клинический центр клеточных технологий». Материалом исследования являются результаты практического применения гематопоэтических стволовых клеток ПК из Самарского банка с 2003—2019 гг.

Методы исследования: статистический, системного анализа, социологический.

Результаты. Самарский банк ПК — единственный в РФ, интегрированный в Международный регистр доноров костного мозга и банков ПК BMDW (с 2012 г.). Самарский регистр — первый и единственный из РФ, получивший аккредитацию WMDA в 2016 г.

Из Самарского банка ПК за все время работы было передано для трансплантации 63 образца ПК для онкогематологических пациентов. Из них 31 — в российские трансплантационные центры (Москва, Санкт-Петербург, Екатеринбург) и 32 в зарубежные (ЮАР, Англия, Дания, Венгрия, Белоруссия, Норвегия, Австрия, Израиль,

Польша, Нидерланды, Австралия, Канада). Оценка результатов трансплантации ПК проведена по полученным отчетам трансплантационных центров (25 пациентов). Подбор образцов ПК осуществлялся по результатам HLA-типирования по 3 локусам. Совместимость с реципиентом 4 из 6 наблюдалась в 33,4% случаев, 5 из 6 — 42,8%, 6 из 6 — 23,8%. Каждый образец ПК содержал не менее 150×10^7 ядродержащих клеток, количество жизнеспособных CD34⁺-клеток не менее $1,6 \times 10^6$, все образцы имели отрицательные результаты на гемотрансмиссивные инфекции.

Наиболее частая патология для трансплантации ГСК: острый лимфобластный лейкоз и острый миелобластный лейкоз. Реже встречающаяся патология: хронический миелобластный лейкоз, первичный иммунодефицит, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, миелодиспластический синдром, лимфома, первичный Х-сцепленный лимфопрлиферативный синдром, первичный семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, первичный иммунодефицит, синдром Вискотта-Олдрича, синдром «голых» лимфоцитов. Возраст пациентов от 6 месяцев до 69 лет (средний возраст 15+9 лет). Общая выживаемость после трансплантаций ПК составила 72%, общая безрецидивная выживаемость — 56% (медиана наблюдения 365 дней).

Кроме того, из Самарского банка ПК за последние 5 лет увеличилась активация образцов ПК для применения в других направлениях медицины: стоматологии — 15 пациентов, хирургии (циррозы, атеросклероз сосудов НК) — 51, неврологии (ДЦП, аутизм) — 210 пациентов.

Выводы. Частота выдачи образцов ПК из Самарского банка ПК для лечения онкогематологических пациентов составила 0,75%, для целей регенеративной медицины — 2%.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ СЕНСИТИЗАЦИЯ α -1A-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ КАК МЕХАНИЗМ ВЫБОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОЙ СУДЬБЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Анастасия Михайловна Иванова, Вадим Игоревич Чечехин, Александр Владимирович Балацкий, Вероника Юрьевна Сысоева, Полина Максимчик, Наталия Игоревна Калинина
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

tyurinkuzmin.p@gmail.com

Ожирение и метаболические болезни, ассоциированные с ним, приобрели в последние десятилетия характер пандемий. Увеличение объема жировой ткани может происходить за счет гипертрофии адипоцитов, при которой увеличивается размер отдельных клеток из-за накопления жировых капель. При этом формируется нездоровый фенотип жировой ткани с высоким воспалительным фоном и слабой секреторной активностью. Более здоровый механизм разрастания жировой ткани — гиперплазия — происходит за счет увеличения количества адипоцитов. При этом сценарии формирующиеся адипоциты имеют здоровый фенотип и активно секреторируют гормоны жировой ткани адипокины. Новые адипоциты происходят в результате дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК). МСК в жировой ткани выполняют три ключевых группы функций. Во-первых, дифференцировка в адипоциты в ходе гиперплазии. Во-вторых, формирование стромы для вновь образующихся клеток и поддержание имеющегося

матрикса. В третьих, самообновление и поддержание стволовости МСК. Баланс между этими процессами лежит в основе здорового функционирования жировой ткани и сохранения ее регенеративного потенциала.

Ранее мы обнаружили, что один из ключевых гормональных регуляторов МСК, норадреналин, запускает уникальной для клеток взрослого организма процесс гетерологической сенситизации. При действии на МСК норадреналина основные физиологические ответы опосредуются β -адренорецепторами. Однако через 6 часов после первичного воздействия норадреналина в МСК экспрессируется дополнительное количество функционально-активных α 1A-адренорецепторов, а β -адренорецепторы подвергаются даун-регуляции. Это приводит к тому, что на повторную обработку норадреналином МСК отвечают активацией α 1A-адренорецепторов и кальциевой сигнализацией, а не через цАМФ-зависимый сигнальный каскад β -адренорецепторов. Такое переключение сигнализации приводит, с одной стороны, к подавлению адипогенной дифференцировки МСК, с другой, к переходу клеток на полностью анаэробный метаболизм и повышению синтетической функции клеток. Анаэробный гликолиз является одной из важнейших характеристик стволовых клеток, как здоровых, так и раковых, а синтетическая активность МСК необходима для обновления и здорового разрастания жировой ткани.

Таким образом, мы обнаружили в МСК новый механизм гетерологической сенситизации, который влияет на метаболический статус клеток и регулирует переход между дифференцировочным и синтетическим фенотипами стволовой клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00421.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ

Елизавета Ивановна Устьянцева¹⁻⁴, Сергей Петрович Медведев¹⁻⁴, Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия;

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

ustyantseva@bionet.nsc.ru

Увеличение средней продолжительности жизни привело к тому, что заболевания нейродегенеративной группы стали встречаться чаще. Их основная особенность — неуклонная гибель клеток нервной системы, которая, в свою очередь, приводит к утрате специфических функций: когнитивных и двигательных. Несмотря на большое количество исследований, проведенных за последние годы, не были раскрыты точные механизмы развития нейродегенеративных заболеваний, так же как и не было разработано эффективных препаратов, способных отменить или замедлить развитие патологии. Несмотря на то, что клинически, каждое нейродегенеративное заболевание имеет свои специфические симптомы, на молекулярном уровне, они все обладают схожими паттернами патологических процессов, которые приводят к гибели

нейронов. Развитие технологий получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 и направленной дифференцировки *in vitro* привело к появлению новой тенденции в биомедицине: моделированию заболеваний на линиях ИПСК. Одним из способов исследования интересующих процессов на подобной модели являются генетически-кодируемые биосенсоры, которые позволяют в режиме реального времени регистрировать молекулы-мессенджеры, метаболиты и активность ферментов.

В данной работе была разработана платформа на основе стволовых клеток, предназначенная для исследования клеточных процессов, вовлеченных в нейродегенерацию: окислительный стресс, апоптоз и стресс эндоплазматического ретикулума.

Был создан набор плазмидных донорных векторов для CRISPR-опосредованной встройки последовательностей биосенсоров в геном. Применение системы CRISPR/Cas9 в данном случае позволило произвести направленную встройку данных последовательностей в так называемый «safe-harbor» locus *AAVS1* и избежать негативных последствий случайных интеграций последовательностей. Кроме того, из мононуклеаров периферической крови больного БАС были получены ИПСК. На их основе, используя CRISPR/Cas9 в форме рибонуклеопротеиновых комплексов и донорные плазмиды, было получено 5 трансгенных линий ИПСК со встройкой последовательностей разных биосенсоров под контролем доксициклин-зависимого промотора. То же самое было сделано на основе условно-здоровой контрольной линии ИПСК. Было показано, что элементы биосенсоров функционально активны и способны продуцировать флуоресцентный сигнал в ответ на специфические стимулы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00440.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ДОЗ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Дарья Юрьевна Усупжанова, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виктория Андреевна Никитина, Юлия Борисовна Сучкова, Ирина Владимировна Кобзева, Виталий Андреевич Брунчуков, Анна Андреевна Расторгуева, Валентин Андреевич Брумберг, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов

ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

usupzhanova94@mail.ru

Введение. На протяжении всей жизни человек постоянно подвергается воздействию низких доз радиационного излучения, как фонового, так и в рамках медицинской диагностики и лечения, от свалок радиоактивных отходов, в ходе профессиональной деятельности и во время авиаперелетов. Однако, не смотря на постоянно увеличивающееся количество источников низкодозового излучения, на сегодняшний день остаётся не изученным воздействие низких доз радиации на аспекты жизнедеятельности человека, в частности, на стволовые клетки.

Цель: изучить влияние низких доз рентгеновского излучения на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека из различных источников для оценки отдаленных последствий *in vitro*.

Результаты: на ранних и поздних этапах культивирования было обнаружено изменение уровней поверхностных антигенов CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) и CD105 (эндоглин), однако эти изменения были различными для МСК из различных типов тканей, а эффекты дозы 80 мГр отличались от эффектов доз 250 и 1000 мГр, линейная зависимость доза-эффект в большинстве случаев не наблюдалась. Наибольшая стабильность уровней поверхностных антигенов после облучения была отмечена для МСК слизистой ткани десны, на основании этого данный тип МСК был выбран для дальнейших исследований. Было показано, что при длительном культивировании пролиферативная активность МСК слизистой ткани десны, облученных в дозе 50 мГр, сравнима с группой контроля, в то время как дозы 100 и 250 мГр демонстрировали ее снижение. Далее оценка эффектов низких доз радиации была сфокусирована на «эффекте свидетеля». Необлученные МСК демонстрировали существенное снижение ПА при культивировании в кондиционной среде с клеток, получивших дозу облучения 1000 мГр, а также ее повышение при культивировании в кондиционной среде клеток, получивших дозы облучения 50, 100 и 250 мГр. Отмечена «адаптивность» клеток, предварительно облученных в дозе 250 мГр, к угнетающему пролиферацию действию кондиционной среды клеток, получивших дозу облучения 1000 мГр.

Заключение: было показано, что эффекты одних и тех же доз могут быть различными для МСК из различных типов тканей, а также эффекты доз 50, 80, 100 и 250 мГр отличаются от эффектов дозы 1000 мГр. Кондиционные среды облученных клеток оказывают воздействие как на облученные, так и не облученные МСК («эффект свидетеля»). В случае культивирования в кондиционных средах предварительно облученных МСК отмечен адаптивный ответ.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРИРОВАННОЙ ДИОКСИДНОЙ ПЛЕНКИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТАМИ ФИБРОЗНОЙ КАПСУЛЫ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ МАТЕРИАЛА

Федор Алексеевич Фадеев¹, Юлия Ярославовна Хрунык², Сергей Владимирович Беликов², Даяна Владимировна Луговец¹, Оксана Владимировна Губаева¹, Сергей Леопольдович Леонтьев¹, Сергей Владимирович Сазонов¹, Артемий Александрович Попов²

¹ *ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия;*

² *ФГАОУ ВО Уральский Федеральный Университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия*

fdf79@mail.ru

Титановый сплав марки ВТ1-0 является одним из наиболее часто используемых материалов для изготовления дентальных имплантатов. Остеоинтеграция имплантата во многом определяется характером протекания репаративных процессов после имплантации и формирования контакта между поверхностью металла и костной тканью. Для улучшения контакта с клетками костной ткани поверхность имплантата может быть подвергнута различным видам физической или химической модификации, одним из которых является формирование структурированной пленки из нанотрубок, образованных диоксидом титана. Пленка из нанотрубок повышает уровень адгезии и пролиферации

остеобластов. В то же время, модификация поверхности может оказать стимулирующее влияние на активность фибробластов при репарации после имплантации и, соответственно, способствовать образованию фиброзной капсулы вокруг имплантата, что, в свою очередь, повысит риск его отторжения.

Нами была оценена функциональная активность фибробластов на поверхности титана с необработанной поверхностью и с поверхностью, покрытой структурированной пленкой из диоксидных нанотрубок. Уровень пролиферативной и секреторной активности фибробластов на обоих типах поверхности существенно не различался. Также не было выявлено значительных различий в уровне секреции проколлагена I клетками на исследованных поверхностях, а также в количестве откладываемого на обработанном и необработанном титане коллагена (составляющего основу фиброзной капсулы). В то же время, на поверхности с оксидной пленкой отмечен значительно более высокий уровень отложения неколлагеновых сывороточных белков. Достоверных различий в количестве выделяемых фибробластами провоспалительных цитокинов не отмечено, за исключением хемокина CXCL8, уровень секреции которого на поверхности с нанотрубчатой оксидной пленкой выше, чем на необработанной.

Таким образом, проведенные исследования не выявили повышенной активности фибробластов при контакте с титановой поверхностью, покрытой слоем диоксидных нанотрубок, которая могла бы привести к избыточному отложению коллагена на поверхности имплантата и к формированию вокруг него фиброзной капсулы. Более высокий уровень отложения неколлагеновых белков на обработанном титане может способствовать адгезии остеобластов. В то же время, повышенный уровень секреции хемокина CXCL8 фибробластами на титане с оксидной пленкой может являться причиной более интенсивной воспалительной реакции при имплантации материала с обработанной поверхностью.

КАЛЬЦИЙФОСФАТНАЯ КЕРАМИКА ИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРОШКОВ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Инна Вилоровна Фадеева¹, Татьяна Викторовна Сафронова², Александр Сергеевич Фомин¹, Ольга Станиславовна Антонова¹, Ирина Ивановна Селезнева³

¹ Институт металлургии и материаловедения РАН, Москва, Россия;

² Факультет наук о материалах, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

fadeeva_inna@mail.ru

Важным направлением современного медицинского материаловедения является разработка кальцийфосфатных материалов для восстановления поврежденных костных тканей. Фосфаты кальция используют в медицинской практике с середины прошлого века, что связано с их химическим и фазовым подобием костной ткани человека. Помимо биосовместимости, такие материалы должны резорбироваться в организме со скоростью, сравнимой с образованием новой костной ткани.

Цель работы заключалась в разработке нового способа получения керамических кальцийфосфатных материалов для медицинских применений.

С использованием механохимической активации из лактата кальция пентагидрата $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и гидрофосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при мольном соотношении Ca/P для исходных солей 1; 1,5 и 1,67 были получены порошки фосфатов кальция. Фазовый состав полученных порошков после синтеза и сушки был представлен дикальцийфосфатом дигидратом $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, аморфным фосфатом кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ и гидроксипатитом кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ соответственно.

Для исследования термической эволюции фазового состава и микроструктуры образцы подвергали термической обработке при различных температурах в интервале 700–1100 °C. После обжига при 1100 °C фазовый состав керамики был представлен β-пирофосфатом кальция β- $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, витлокитом β- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и оксипатитом кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$, соответственно.

В экспериментах *in vitro* для оценки биосовместимости полученных кальцийфосфатных керамических материалов использовали культуру первичных клеток DPSC 32 на 5 пассаже, выделенных из пульпы зуба третьего моляра. Для исследования пролиферативной активности клеток на поверхности полученных керамических материалов была использована трансгенная культура клеток DPSC, несущая ген флуоресцентного зеленого белка (GFP-DPSC).

Результатам тестирования *in vitro* свидетельствуют о том, что полученные кальцийфосфатные керамические материалы поддерживают адгезию и распластывание субстратзависимых клеток человека и могут быть признаны биосовместимыми.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11079.

КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ИЗ ГИДРОКСИПАТИТА И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Инна Вилоровна Фадеева¹, Александр Сергеевич Фомин¹, Сергей Миронович Баринов¹, Галина Анатольевна Давыдова², Ирина Ивановна Селезнева², Марат Ревгеревич Гафуров³, Фадис Фанилович Мурзаханов³, Абдулрахман Исмаил Ахмед³, Георгий Владимирович Мамин³

¹ Институт металлургии и материаловедения РАН, Москва, Россия;

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

fadeeva_inna@mail.ru

Фосфаты кальция (ФК) являются основным неорганическим компонентом костной и зубной ткани. Известно, что проведение синтеза ФК в присутствии полимеров (коллаген, желатин, крахмал, хитозан и др.) приводит к формированию нанокристаллов ФК с контролируемым размером и морфологией. На основании такого подхода могут быть получены композиты полимер — нанокристаллы ФК *in situ*, без операции смешения компонентов, подобно тому, как это происходит в организме в процессе ремоделирования костной ткани.

Для синтеза порошков композитов ГА с ПВП использовались водные растворы нитрата кальция, гидрофосфата аммония и поливинилпирролидона. Осаждение фосфатов кальция проводили при комнатной температуре (20–25 °C) при pH 11,5 в соответствии с уравнением: $10\text{Ca}^{2+} + 6\text{HPO}_4^{2-} + 8\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{NH}_4^+ + 6\text{H}_2\text{O}$.

Для получения композитов ГА/ПВП синтез проводили в растворах ПВП концентрации 2,76; 5,52 и 11 г/моль. Для регулирования кислотности использовали 10% водный раствор аммиака. Согласно данным РФА, композиты ГА-ПВП после синтеза являются рентгено-аморфными. В результате термической обработки при 400°C происходит формирование апатитовой структуры. По результатам ПЭМ выяснено, что при отжиге композитов при 400°C образуются небольшие агломераты, состоящие из отдельных кристаллических частиц ГА, в результате чего размер частиц (по данным ПЭМ) несколько больше ОКР. С применением метода фотоиндуцированного ЭПР установлено наличие взаимодействия между ГА и ПВП.

Исследование цитотоксичности материалов проводили с использованием вытяжек из материалов согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 10993.5-15 на культуре фибробластов линии NCTCclone L929 с помощью МТТ-теста. Вытяжки из материалов ГА и ПВП не оказывали угнетающего действия на фибробласты.

Однако при посеве на поверхность исследуемых материалов мезенхимальных стромальных клеток человека DPSC (метод прямого контакта) установили значимые различия с контролем, что, по-видимому связано с высокой степенью гидрофильности ПВП.

ЛОКАЛЬНАЯ ДОСТАВКА ПИРФЕНИДОНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПЕРИИМПЛАНТНОГО ФИБРОЗА: ЭКСПЕРИМЕНТ IN VIVO

Алексей Леонидович Файзуллин¹, Семен Николаевич Чурбанов¹, Алина Юрьевна Капитанникова¹, Марк Валерьевич Токарев², Даниил Леонидович Мудряк², Яна Игоревна Христидис¹, Анна Евгеньевна Гуллер^{1,3}, Александр Витальевич Курков¹, Александра Валерьевна Бутенко¹, Петр Сергеевич Тимашев¹, Анатолий Борисович Шехтер¹

¹ Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² Кафедра госпитальной хирургии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ Высшая школа биомедицинской инженерии, Университет Нового Южного Уэльса, Сидней, Австралия

a.l.fayzullin@gmail.com

Введение. Иммуный ответ организма на имплантацию нерезорбируемых биоматериалов приводит к фиброзу, рубцеванию тканей вокруг имплантата. Периимплантационный фиброз склонен к прогрессированию и манифестируется клинически через месяцы и годы после первичной операции. Механизмы хронически текущей реакции на инородное тело слабо изучены. В представленном исследовании, мы разработали модель контролируемо индуцируемого периимплантационного фиброза и применили антифибротический препарат пирфенидон для его контроля.

Методы. Круглые скаффолды из полилактида (10 мм × 1 мм, n=36) были приготовлены методом поверхностного селективного лазерного спекания и использовались как индукторы фиброза. Экспериментальные скаффолды (n=12) были нагружены пирфенидоном (500 мкг). После имплантации скаффолдов в группе положительного контроля (n=12) проводился подкожный

укол раствора пирфенидона (500 мкг) в участок имплантации. Скаффолды были имплантированы в кожные карманы ушей лабораторных кроликов на 30 и 60 суток. Аутопсийные материалы исследовались гистологическим и иммуногистохимическим методами.

Результаты. Локальная доставка пирфенидона привела к снижению зрелости и толщины соединительнотканной капсулы вокруг имплантата, ингибировала трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты и привела к изменению иммунофенотипа клеток инородных тел, характерному для реполяризации макрофагов из профибротического M2 типа в провоспалительный M1 тип. Материал нагруженного пирфенидоном имплантата был в большей степени резорбирован, а окружающие ткани васкуляризировались артериями малого и среднего калибров.

Обсуждение. Локальная доставка пирфенидона привела к выраженным изменениям клеточного и матричного состава в участке имплантации. Антифибротическая профилактика изменила иммунофенотипы фибробластов и макрофагов и нормализовала объем и архитектуру внеклеточного матрикса.

ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ОКТАКАЛЬЦИЙ ФОСФАТА ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Александр Юрьевич Федотов, Артем Александрович Котьяков, Игорь Валерьевич Смирнов, Олег Витальевич Баранов, Сергей Миронович Баринов, Владимир Сергеевич Комлев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

antishurik@mail.ru

Несмотря на значительный прогресс в области имплантационной хирургии, нередко случаи послеоперационных осложнений, вызванных ограниченной биологической активностью и низкой интегрируемостью костных имплантатов. Топография и химия поверхности имплантата играют важную роль в процессе его интеграции в организме, особенно на ранних стадиях имплантации. Шероховатость поверхности имплантата является одним из наиболее важных параметров, влияющих на остеоинтеграцию. Она влияет на адсорбцию белков, адгезию, пролиферацию и распространение клеток. Основным методом поверхностной модификации является формирование биоактивного слоя, в частности биоактивных фосфатов кальция. Существуют различные подходы к формированию покрытий, такие как метод химического осаждения, плазменная обработка, методы магнетронного распыления, однако метод осаждения является наименее энергоемким и наиболее приемлемым. Такое формирование покрытия близко к процессам, происходящим в организме при формировании костной ткани.

Целью работы является разработка метода создания покрытий на основе октакальций фосфата (ОКФ, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) из специальных химически активных буферных растворов на керамических материалах путем перекристаллизации материала исходного имплантата. Буферный химически активный раствор содержит высокую концентрацию фосфат-ионов (PO_4^{2-}) и ацетат-ионов (CH_3COO^-). Исходный имплантат на основе гидроксиапатита (ГА , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) либо α - или β -модификаций трикальцийфосфата (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) погружают в буферный раствор и за счет перекристаллизации через

промежуточную фазу дикальцийфосфат дигидрата (ДКФД, $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) формируется ОКФ. Данный процесс протекает по эпитаксиальному механизму. Кроме того, кристаллы исходная керамика служит не только предшественником, но и источником ионов кальция для образования кристаллов ОКФ.

Разработана термодинамическая модель формирования покрытий на основе ДКФД и ОКФ и выявлены оптимальные условия формирования низкотемпературных фосфатов кальция (состав, концентрация буферного раствора, температура, pH и время процесса).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-33-20258 мол_а_вед). Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075–00746–19–00.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА С ПОЗИЦИЙ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НИШУ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Галина Васильевна Федотовских, Манарбек Бапович Аскарар, Дана Талаповна Сайпиева

АО «Национальный научный медицинский центр» Нур-Султан (Астана), Казахстан

ualikd@mail.ru

Регенерация слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) зависит от пролиферативной активности стволовых клеток крипт и микроокружением. Патогенетические механизмы неспецифического язвенного колита (НЯК) связаны с иммунологическими нарушениями, а потому применение МСК КМ являются в определенной мере обоснованны ввиду их иммуномодулирующих, иммуносупрессивных и трофических эффектов.

Трансплантируемые мезенхимальные стволовые клетки аутогенного костного мозга (МСК КМ), полученные в процессе 4–5 недельного культивирования, трансплантировали внутривенно, однократно, в количестве 120×10^6 клеток в 200 мл физиологического раствора.

Методика. Гистологические, светооптические и электронномикроскопические исследования 106 биоптатов СОТК были взяты у 15 больных НЯК до и после трансплантации МСК и проанализированы с современных позиций «ниши стволовой клетки» и механизмов участия МСК в регуляции регенераторных процессов. Полутонкие срезы окрашивались по С. Humphrey и F. Pittman (1974). Наблюдение и съемку ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе Libra 120 (C. Zeiss).

Несмотря на сохранение язвенных дефектов покровного эпителия (2–3 балла), однократная трансплантация МСК через 6 месяцев положительно влияла на воспаление (с 2–3 до 1–2 баллов по K. Geboes) и плотности (с 2–3 до 1 балла) воспалительной инфильтрации, восстановление структуры покровного эпителия и эпителия крипт СОТК. Наблюдалась пролиферация эндотелия кровеносных капилляров и терминальных нервных окончаний в собственной пластинке СОТК. Отмечены ультраструктурные признаки снижения функциональной активности плазматических клеток, высокая фагоцитарная и секреторная активность макрофагов, имевших плотные контакты с лимфоцитами и плазматическими, повсеместное расположение тельцов в собственном слое СОТК. Увеличилось количество крипт с высокой пролиферативной активностью и дифференцировкой

шеечного эпителия и качественная перестройка структуры покровного эпителия, увеличение бокаловидных клеток и восстановление микроворсинок щеточной каемки и межклеточных связей цилиндрических клеток.

Таким образом, МСК КМ запустили механизмы регуляции всех систем, расположенных в стромальной ткани, окружающей покровный и железистый компоненты «регенераторной ниши» СОТК. Структурно-функциональные изменения иммунокомпетентной, микроциркуляторной, нейротрофной, клеточных и внеклеточных компонентов соединительнотканной систем сыграли позитивную роль в пролиферации покровного эпителия.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТЕНКИ КИШЕЧНИКА КРЫСЫ В МОДЕЛИ ЦИРКУЛЯРНОГО ДЕФЕКТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИБРОИН-СОДЕРЖАЩЕГО СКАФФОЛДА

Александр Владимирович Федулов¹, Мария Сергеевна Котлярова², Анна Сергеевна Солдатенко², Анастасия Михайловна Мойсенович², Дмитрий Юрьевич Семенов¹, Иван Викторович Бессонов³, Александр Владимирович Куликов⁴, Анастасия Юрьевна Архипова^{1,2}, Михаил Михайлович Мойсенович²

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия;

² Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ АО «Перспективные медицинские технологии», Москва, Россия;

⁴ Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, Пущино, Россия

iksanderf@mail.ru

Повреждение стенок кишечника в результате травм и патологических изменений различной этиологии приводит к нарушению его функционирования и другим тяжелым последствиям — вплоть до летального исхода. Восстановление целостности или замещение утраченных участков органов желудочно-кишечного тракта может быть достигнуто с применением биорезорбируемых конструкций. В данной работе была оценена перспективность использования для этой цели фиброин-содержащих скаффолдов в виде трубок, сформированных с применением фотополимеризации на основе метакрилированных производных фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* и желатина.

Исследование проводили в модели циркулярного дефекта тощей кишки крысы: фрагмент скаффолда в виде трубки имплантировали в просвет рассеченного органа таким образом, чтобы между приводящим и отводящим краями кишки оставался зазор протяженностью 3 мм. Состояние органов ЖКТ оценивали визуально, а протекание процессов регенерации в области повреждения изучали с использованием гистологических техник. Через 1 неделю после операции имплантат не был обнаружен, а на месте дефекта была сформирована грануляционная ткань с выраженной сетью кровеносных сосудов. Иммуногистохимический анализ препаратов, полученных через 2 недели после начала эксперимента, выявил наличие большого количества фибробластоподобных клеток, экспрессирующих гладкомышечный α -актин. Такой фенотип характерен для субпопуляций клеток, участвующих в ремоделировании внеклеточного

матрикса и обеспечивающих контракцию тканей. Через 4 недели после операции в области повреждения наблюдалось восстановление всех структурных и функциональных элементов стенки кишечника: слизистой, подслизистой и серозной оболочек, а также слоя гладких мышц. При этом в области дефекта через 4 недели еще наблюдались участки мышечного слоя протяженностью менее 1,5 мм, представленные нерегулярными мышечными волокнами. Полное восстановление стенки органа, в том числе двух слоев гладких мышц (продольного и циркулярного) было показано через 8 недель после формирования дефекта. Кроме того, выявлялись подслизистые и мышечные нервные сплетения кишечника.

Таким образом, скаффолд на основе метакрирированных производных фиброина и желатина обеспечивает герметичность органа на ранних этапах заживления в модели циркулярного дефекта и стимулирует процессы регенерации, что привело к восстановлению его структурной целостности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-34-00875).

ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК MORRBID СВЯЗАНА С ПРОЦЕССИНГОМ ПРЕ-МРНК В ГЕПАТОЦИТАХ

Анна Степановна Фефилова¹, Ольга Владимировна Сергеева¹, Павел Мазин¹, Игорь Игоревич Киреев², Тимофей Сергеевич Зацепин¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва, Россия;

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

anny.fefilova@gmail.com

Длинные некодирующие РНК (днРНК) это РНК длиной более 200 нуклеотидов, которые не кодируют в своей последовательности белок и составляют наиболее обширную часть транскрибируемого генома. днРНК имеют множество функций в различных клеточных процессах, таких как ремоделирование хроматина, транскрипция, сплайсинг, трансляция и т.д. Некоторые днРНК имеют несколько транскриптов, которые могут обладать тканеспецифичностью или выполнять различные функции в зависимости от условий. днРНК MORRBID регулирует продолжительность жизни нейтрофильных гранулоцитов и эозинофильных гранулоцитов посредством транскрипционной регуляции гена, *Vcl2l11*, находящегося в непосредственном геномном окружении днРНК MORRBID [Kotzin et al, Nature 2016]. В нашей работе мы демонстрируем, что ингибирование экспрессии днРНК MORRBID приводит к стагнации клеточного цикла на стадии перехода G2/M. Анализ протеома клеток с пониженной экспрессией гена MORRBID показал значительное снижение экспрессии белков, вовлеченных в процессинг пре-мРНК, включая белки, принадлежащие к группе hnRNP, и несколько белков, являющихся составляющими U1 и U2 белковых сплайсинг комплексов. Мы показали методом РНК пулдаун анализа, что MORRBID напрямую взаимодействует с белками, участвующими в регуляции пре-мРНК процессинга. Также, транскриптомный анализ продемонстрировал многочисленные изменения альтернативного сплайсинга в клетках с нокадаун MORRBID. Таким образом, было обнаружено, что днРНК MORRBID может быть вовлечена в регуляцию созревания пре-мРНК и регуляцию сплайсинга в гепатоцитах.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ 3D БИОПЕЧАТИ

Анна Филимонова, Евстратова Екатерина, Петр Шегай, Юлия Елисеева

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

filimonowa.af@gmail.com

Прогресс в разработке новых материалов для биочернил в 3D-биопечати не может обойтись без трудностей. Основная цель разработок состоит в том, чтобы минимизировать потерю использованных клеток, улучшить межклеточные взаимодействия и механические свойства ткани, попытаться васкуляризовать крупные тканевые конструкции и изучить дополнительные соединения для поддержки 3D биопечатных конструкций.

Гидрогели являются наиболее удобной разновидностью материала для поддержки клеток, однако существуют некоторые особенности, связанные с биопечатью. Гидрогели не содержат специфических белков межклеточного матрикса для конкретных типов клетки. Клеточная микросреда, которую создают гидрогели, может значительно отличаться от нативных тканей. Гидрогели разлагаются намного медленнее *in vitro* из-за недостатка ферментов, ответной реакции и отсутствия кровотока. Тем не менее, гидрогели разрабатываются так, чтобы они деградировали *in vivo* синхронно по отношению к формированию новых тканей. Гидрогели инкапсулируют и удерживают клетки, ограничивая их взаимодействие, однако трудно достичь высокой плотности клеток. Концентрация гидрогелей играет важную роль, поскольку повышенная концентрация улучшает механические свойства, но ограничивает биологическую активность. Более жесткие гидрогели требуют более высокого уровня давления для экструзии или образования капель. Однако высокая концентрация гидрогеля снижает подвижность клеток, что приводит к ограниченной пролиферации клеток. Другим важным недостатком является токсичность, наличие радиационных продуктов, которые могут быть вредными для клеток. Также к важным ограничениям использования гидрогелей можно отнести их нестабильность.

Будущее создания материалов для 3D-биопечати должно привести к решениям, которые укрепят механические свойства для стабилизации конструкций и обеспечат биологическую активность клеток. Эти соединения должны позволить лучше взаимодействовать клеткам и создать среду для новых функциональных тканей, которые будут хорошо васкуляризованы. Вышеупомянутые проблемы являются одними из существенных причин, из-за которых исследователи еще далеки от биопечати функциональных органов клинически значимого размера. Однако на сегодняшний день разработанные материалы биочернил и процессы биопечати на пике развития, и 3D-биопечать будет ключевой технологией будущей тканевой инженерии, регенеративной терапии и фармацевтики.

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ С Т-ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Иван Юрьевич Филин, Кристина
Викторовна Китаева, Дарья Сергеевна
Чулпанова, Альберт Анатольевич Ризванов,
Валерия Владимировна Соловьева

Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет, Казань, Россия

filin.ivy@gmail.com

Внеклеточные везикулы (ВВ) опухолевых клеток благодаря способности сливаться с клетками-реципиентами посредством эндоцитоза и высвобождать свое содержимое в цитоплазму клетки-реципиента рассматриваются как перспективный вектор для целевой доставки различных противоопухолевых агентов. Выделенные из опухолевых клеток ВВ несут на поверхности те же антигены, что и родительские клетки, таким образом, являясь перспективным источником опухолевых антигенов для их презентации клеткам иммунной системы. Благодаря вышеописанным свойствам ВВ опухолевых клеток могут быть использованы для разработки терапевтических вакцин для лечения онкологических заболеваний. Целью настоящей работы явилось проанализировать взаимодействие ВВ клеток карциномы толстой кишки с Т-лимфоцитами человека in vitro.

Материалы и методы. ВВ были получены из клеточной линии карциномы толстой кишки HCT 116 (ATCC® CCL-247™). Мононуклеарные клетки из периферической крови (МКПК) выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла (1,077 г/см³). Далее к МКПК, культивируемому в среде RPMI с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы, добавляли ВВ в концентрации 20 мкг/мл. В качестве контроля использовали МКПК без добавления ВВ. Совместное культивирование МКПК и ВВ проводили в течение 3 суток, после чего МКПК окрашивали с помощью следующих антител к CD3, CD4, CD8a, CD38, CD56, CD107a, содержащих флуоресцентную метку (все Biolegend, США). Результаты анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Aria III (BD Biosciences), с использованием программного обеспечения FACSDiva. Взаимодействие ВВ и МКПК исследовано с помощью лазерной конфокальной микроскопии.

Результаты и их обсуждение. Нами показано, что при совместном культивировании ВВ клеток HCT 116 способны сливаться с МКПК, что приводит к их активному взаимодействию. С помощью проточной цитофлуориметрии показано, что добавление ВВ клеткам HCT 116 к МКПК увеличивает количество CD3⁺ Т-лимфоцитов на 5% по сравнению с контрольными клетками без добавления ВВ. При этом не было отмечено статистически значимых различий в составе других исследуемых популяций.

Таким образом, благодаря способности представлять опухолевые антигены клеткам иммунной системы ВВ опухолевых клеток являются перспективным объектом для разработки новых методов терапии онкологических заболеваний. Однако необходимы дальнейшие исследования в данной области для изучения механизмов взаимодействия ВВ с иммунными клетками и возможных путей регуляции иммунного ответа.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОРНК И ИХ МРНК-МИШЕНЕЙ В МОЗГЕ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРОПЕПТИДА СЕМАКС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Иван Борисович Филиппенков¹, Василий
Васильевич Ставчанский¹, Алина
Евгеньевна Денисова^{2,3}, Леонид Васильевич
Губский^{2,3}, Николай Федорович Мясоедов¹,
Светлана Андреевна Лимборская¹,
Людмила Васильевна Дергунова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной генетики
Российской академии наук, Москва, Россия;

² Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский национальный
исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное
учреждение Федеральный центр
цереброваскулярной патологии и инсульта
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия

Filippenkov@img.ras.ru

Ишемический инсульт занимает одно из первых мест в структуре общей смертности населения России. Изучение молекулярных механизмов повреждения, а также разработка новых стратегий, направленных на лечение или предотвращение этого заболевания, относятся к числу важнейших задач современной медицины. В настоящее время убедительно показано, что в ответе на патологическое воздействие участвуют как РНК, кодирующие белок (мРНК), так и различные типы некодирующих РНК, к числу которых относятся микроРНК. В настоящем исследовании применение транскриптомного анализа с использованием транзитной окклюзии средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс позволило нам существенно детализировать механизмы действия нейропептидного препарата семакс, уже многие годы широко используемого в неврологической практике, в том числе при лечении ишемического инсульта и его последствий.

Для изучения механизмов нейропротективного эффекта семакса с помощью метода RNA-Seq проведен сравнительный анализ уровня мРНК и микроРНК в отделах мозга крыс, подвергнутых tMCAO, получавших семакс или физиологический раствор. Под воздействием семакса в мозге крыс с ишемией более чем в 1,5 раза ($\text{adj} < 0,05$) изменилась экспрессия 139 микроРНК. С использованием биоинформатического анализа баз данных mirdb, mirtarbase и diana для большинства из них обнаружены мРНК-мишени. Функциональная аннотация данных мРНК-мишеней позволила выявить 78 сигнальных путей, связанных с воспалением и иммунным ответом, с клеточной пролиферацией и гибелью, с функционированием трофических факторов, а также с нейросигнализацией.

Анализ содержания мРНК-мишеней, показал, что в условиях tMCAO под действием семакса по сравнению с контрольной группой более чем в 1,5 раза ($\text{adj} < 0,05$) изменился уровень 80 из них (45 мРНК увеличили, а 35 — снизили свой уровень). Ассоциативный анализ показал, что мРНК-мишени, увеличившие свой уровень, главным образом связаны с каталитической и рецепторной активностью и с функционированием ионных

каналов, при этом мРНК-мишени, снизившие свой уровень, связаны преимущественно с активностью факторов роста, гормонов, транскрипционных факторов, с каталитической активностью, а также с функциями организации цитоскелета.

Таким образом, полученные результаты могут указывать на участие микроРНК в регуляции экспрессии генов — возможных потенциальных мишеней воздействия пептидного препарата семакс в условиях ишемии-реперфузии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (19-14-00268).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Иван Викторович Фраучи¹, Фарид Вагизович Баширов¹, Сергей Александрович Обыденнов¹, Кирилл Андреевич Жаббаров¹, Леонид Алексеевич Новиченков¹, Эмиль Ильнурович Бариев¹, Дарья Алексеевна Назарова¹, Гареева Регина Рустэмовна¹, Михаил Самуилович Левин²

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

² Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

faridbashirov@yandex.ru

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из основной причины смертности и инвалидности в мире. Несмотря на значительный успех современной терапии ЧМТ, эффективное лечение, направленное на сдерживание гибели нейронов, для более структурного и функционального восстановления ткани мозга, отсутствует.

Разработано большое количество экспериментальных моделей ЧМТ на животных для проведения доклинических испытаний новых методов лечения. Одной из наиболее распространенных моделей ЧМТ является модель контролируемого коркового повреждения. Для этой модели необходимо ударное устройство, которое подводится к неповрежденной твердой мозговой оболочке и наносит удар с заранее заданными параметрами и глубиной. Преимуществом данного метода является возможность контролировать тяжесть ЧМТ. Другая модель жидкостно-перкуSSIONной травмы мозга наносится путем быстрого введения солевого раствора под давлением в мозговую оболочку с помощью краниотомии. Этот тип травмы вызывает физиологические реакции и морфологические изменения, схожие с повреждениями головного мозга в клинике. В модели ЧМТ с ударным ускорением используют пистолет с невыпадающим затвором, калиброванный маятник или сброшенный вес. Серьезность травм этого типа модели можно регулировать, изменяя массу груза или расстояние падения. В отличие от травмы с ударным ускорением, модель травмы с вращательным ускорением использует угловое ускорение головы животного, что вызывает деформацию мозговой ткани.

Применение выше описанных моделей наиболее целесообразно на крупных лабораторных животных, например на мини-пигах. Наибольшим преимуществом крупных животных является сходство с человеческим мозгом. Гиренцефалическая морфология позволяет глубже исследовать проявления травмы в глубине борозд. Большой размер животного и относительно высокий объем белого вещества особенно ценны при исследованиях с использованием методов

нейровизуализации и мониторинге сердечно-сосудистой системы. В отличие от грызунов без тенториума, у крупных животных более выражены повышение внутричерепное давление и отёк. Кроме того, объем спинномозговой жидкости у грызунов незначителен, что затрудняет её анализ. Долгая продолжительность жизни и сходство в процессах нейрорегенерации с человеком делают крупных животных более эффективными для изучения долгосрочных последствий травм. Таким образом, использование адекватной модели ЧМТ и крупных лабораторных животных позволит повысить трансляционный потенциал доклинических испытаний.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИНСУЛЬТА

Иван Викторович Фраучи¹, Сергей Александрович Обыденнов¹, Фарид Вагизович Баширов¹, Ильфат Фаридович Галаятдинов¹, Дарья Алексеевна Назарова¹, Эмиль Ильнурович Бариев¹, Леонид Алексеевич Новиченков¹, Кирилл Андреевич Жаббаров¹, Гареева Регина Рустэмовна¹, Михаил Самуилович Левин²

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

² Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

ivanfrauchi@yandex.ru

Модели инсульта на грызунах широко применяются в доклинических исследованиях поскольку использование мелких лабораторных животных в эксперименте имеет ряд преимуществ, таких как стоимость, не сложное предоперационное и послеоперационное ведение и наличие достаточного количества поведенческих тестов для грызунов. На сегодняшний день эффективность разнообразных терапевтических подходов к лечению инсульта была доказана на моделях у животных в доклинических исследованиях, но дальнейшее внедрение таких препаратов в клинику потерпело неудачу. Одной из важнейших причин этих неудач являются большие отличия между мелкими лабораторными животными и людьми в отношении физиологических и патофизиологических характеристик. Сужение разрыва между моделями инсульта на мелких животных и человеческим инсультом для повышения трансляционного потенциала доклинических испытаний нейропротекторных препаратов является актуальным вопросом в регенеративной медицине.

Крупные животные схожи с человеком по поведенческим характеристикам, сопутствующим осложнениям, факторам риска цереброваскулярных заболеваний, анатомическому строению мозга и кровеносных сосудов. В частности, их физиологические особенности, такие как сосудистая реакция, воспалительный ответ и восстановление после инсульта, близки к таковым у человека. Подобно людям, большинство крупных животных имеют гиренцефальный мозг и более развитую кору головного мозга, а так как белое вещество и серое вещество проявляют различную чувствительность к ишемии головного мозга, результаты, полученные на крупных животных, больше напоминают инсульт у человека. Приборы, используемые в клинической практике для контроля физиологических параметров, таких как давление крови, частота сердечных сокращений и дыхание, могут быть применены для крупных животных. К тому же крупные животные имеют большой объем крови, что делает возможным

повторные рутинные анализы крови, обеспечивая более точный контроль физиологических параметров при моделировании на животных. Наконец, использование крупных животных более благоприятно для мониторинга безопасности лекарственных средств из-за их физиологических характеристик, которые очень схожи с человеческими.

Использование крупных лабораторных животных при моделировании инсульта, как ожидается, сузит разрыв между клиническими и доклиническими испытаниями, тем самым повышая трансляционный потенциал достижений фундаментальных исследований инсульта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ПЕРЕМЕЩЕННОМ В ЖЕЛУДОК ДЕМУКОЗТРОВАННОМ ТРАНСПЛАНТАТЕ

Иван Викторович Фраучи, Фарид Вагизович Баширов, Сергей Александрович Обыденнов, Ильфат Фаридович Галаяудинов, Кирилл Андреевич Жаббаров, Эмиль Ильнурович Бариев, Леонид Алексеевич Новиченков, Гареева Регина Рустэмовна¹, Дарья Алексеевна Назарова

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

adversaryofsystem@yandex.ru

Способы стимуляции регенерации слизистой оболочки желудка и кишечника все еще остаются открытыми вопросами в регенеративной медицине, и использование адекватной модели на животных повысит качество доклинических испытаний новых методов терапии, направленных на лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта. В данном исследовании мы проводили экспериментальные оперативные вмешательства с использованием самок мини-пиггов, возрастом 6 месяцев ($n=6$). Под ингаляционным наркозом проводили лапаротомию. Резецировали участок тощей кишки длиной 5–6 см с сохранением питающих этот участок брыжеечных сосудов. Резецированный участок рассекали по противобрыжеечному краю и удаляли слизистую оболочку в его пределах. Непрерывность кишечной трубки восстанавливали наложением анастомоза. На передней стенке желудка рассекали желудочную стенку с образованием дефекта размером 5×6 см, который закрывали вшиванием демукозированной кишечной трансплантата. Лапаротомную рану ушивали. Удаление слизистой оболочки проводили на разную глубину. При поверхностной демукозации кишечного трансплантата удаляли только ворсинки, а часть собственного слоя слизистой с криптами оставались на трансплантате. При глубокой демукозации удаляли всю толщу собственного слоя слизистой до tunica muscularis mucosae. Через 6 месяцев животных выводили из опыта и проводили гистологическое исследование трансплантатов.

При глубокой демукозации на трансплантате формировалась слизистая оболочка, не отличающаяся от слизистой окружающего отдела желудка, покрытая однослойным железистым эпителием. Собственная пластинка слизистой хорошо развита, в ней расположены железы, в которых удается идентифицировать главные и париетальные glanduloциты. При проведении поверхностной демукозации, на трансплантате восстанавливается слизистая оболочка, характерная для тощей кишки, содержащая хорошо выраженные ворсинки и крипты в собственной пластинке слизистой и покрытая каемчатым эпителием с большим количеством бокаловидных клеток.

Важно отметить, что источником посттравматической регенерации слизистой оболочки может быть, как неповрежденный эпителий, окружающий демукозированный участок (при глубокой демукозации), так и оставленные в зоне демукозации эпителиальные клетки (при поверхностной демукозации). Также при глубокой демукозации, подслизистая основа кишечного лоскута не препятствует развитию на ней желудочной слизистой оболочки.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (СВФ МЫШЕЙ) НА БАКТЕРИОФАГ СЕМЕЙСТВА РОDOVIRIDAE ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ЕГО ВВЕДЕНИЯ

Татьяна Семеновна Хабалова, Ирина Петровна Иванова, Эрика Александровна Кащенко

Лаборатория клеточных биотехнологий, ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

khabalovat@gmail.com

В настоящее время накоплены многочисленные данные, свидетельствующие о влиянии микробиоты кишечника на жизненно важные процессы, протекающие в организме животных и человека, и о связи состава микробиоты с развитием ряда патологических состояний. Изучение влияния потенциальных регуляторов микробиома (бактериофагов) на иммунную систему являлось основной задачей нашего исследования. Очищенный препарат потенциально-терапевтического протейного бактериофага РМ16 (полученный в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, V.V. Morozova et al., 2016) был использован для исследования его иммуногенности *in vivo* при различных способах введения мышам линии СВФ. Бактериофаг в количестве 1 мкл/мышь, разведенный в 200 мкл 0,9% NaCl, вводили три раза с интервалом в три недели. Всего было сформировано 4 группы по 10 мышей в зависимости от способа введения: № 1 — внутривенное введение в хвостовую вену; № 2 — внутрибрюшинное введение; № 3 — введение *per os*; № 4 — контроль — интактные мыши. Через две недели после последней вакцинации был произведен забор сыворотки, перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги в концентрации 200 тыс./мл помещали в культуральные флаконы на 2 часа для прилипания; затем культуральную среду удаляли и прилипшие клетки культивировали в бессысывороточной среде в течение 48 часов. Собранные супернатанты замораживали и далее использовали для определения содержания индуцируемой nitric oxide synthase (iNOS) методом ELISA (Cusabio Biotech Co, Cat CSB-E08326m). В сыворотке крови экспериментальных мышей определяли концентрацию IFN- γ и IL-4.

Результаты показали, что концентрация провоспалительного IFN γ зависит от способа введения: при внутривенном введении, концентрация IFN γ снижена по сравнению с контролем ($p=0,005$), а при внутрибрюшинном введении — повышена по сравнению с контролем ($p=0,02$). Также было отмечено, что введение бактериофага *per os* приводит к достоверно значимому увеличению продукции противовоспалительного цитокина IL-4 ($p=0,01$). Эти изменения свидетельствуют об активации Т-клеточного звена иммунитета. Влияния введения фага на продукцию iNOS перитонеальными макрофагами в перечисленных группах мышей не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии активации неспецифического звена иммунитета.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В МОДЕЛИ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МЫШЕЙ

Татьяна Семеновна Хабалова, Эрика Александровна Кащенко, Галина Викторовна Селедцова

Лаборатория клеточных биотехнологий, ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

khabalovat@gmail.com

В ряде работ по изучению мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при почечной недостаточности было показано, что имеющееся регенераторное действие этих клеток не обусловлено процессами дифференцировки клеток и их хомингом. Кроме того, недавние исследования установили, что терапевтический эффект МСК и внеклеточных везикул во многом имеет сопоставимый характер. Однако наличие и описание иммунорегуляторных свойств внеклеточных везикул, присущих МСК пока остаётся неизученным. Таким образом, целью нашей работы было исследование воздействия МСК и полученных из них внеклеточных везикул на параметры клеточного иммунитета у мышей с индуцированной почечной недостаточностью. В качестве модели была использована глицерол-индуцированная почечная недостаточность, обладающая смешанным (ишемическим, токсическим, ретенционным) воздействием на почки, с преимущественным поражением эпителия проксимальных канальцев. Мезенхимальные стволовые клетки были получены из костного мозга сингенных мышей СВА методом адгезии к культуральному пластику. В качестве неспецифического контроля использовали клеточную линию фибробластов L929 (кариотип Н-2b). Для получения внеклеточных везикул клетки подвергали апоптозу в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. Как клетки, так и внеклеточные везикулы вводили внутривенно. Эффекты применения как мезенхимальных стволовых клеток, так и внеклеточных везикул практически не отличались. Зарегистрирована тенденция к спонтанному снижению содержания CD4⁺CD44⁺CD62L⁺, CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ Т-клеток памяти, а также прироста регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток при использовании как клеток, так и внеклеточных везикул. Природа используемых клеток и полученных из них внеклеточных везикул не оказывала существенно значения на конечный результат экспериментов.

СТАРЕНИЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN SITU — ПРИЧИНЫ, МЕХАНИЗМЫ, СЛЕДСТВИЯ

Александр Викторович Халывкин

Институт биохимической физики РАН и ФИЦ «Информатика и Управление» РАН, Москва, Россия

antisenesc@mail.ru

Внутриклеточные стволовые клетки во многом ответственны за поддержание функциональной и структурной целостности организма. Они до конца жизни обновляют органы и ткани при физиологической и репаративной

регенерации. Но с возрастом эти процессы постепенно угасают из-за уменьшения пула стволовых клеток и снижения активности оставшихся. Ряд авторов предполагает, что причина этого в неизбежном, как они думают, старении стволовых клеток in situ. Поэтому, пытаясь этому противостоять, адепты современной регенеративной медицины вводят в организм пожилого реципиента дополнительное количество соответствующим образом подготовленных стволовых клеток и их продуктов. По другой точке зрения количественное и качественное угасание стволового пула не является неизбежным. Поэтому следует пытаться вмешаться в функционирование сигнальных путей, регулирующих активность пула стволовых клеток in situ. Недавно о смене парадигмы и перспективности именно такого подхода заявил в интервью и президент Национального общества регенеративной медицины академик В.А. Ткачук. В биогеронтологии, изучающей причины и механизмы старения, накоплено много данных в пользу именно такого подхода. Во-первых, можно считать доказанным отсутствие у стволовых клеток лимита Хейфлика на предел клеточных делений. Естественно при условии блока их выхода в дифференцировку. В противном случае они дозревают до конечного «продукта» (нейрона, эритроцита и т.п.), не предназначенного для делений (так называемая самоубийственная дифференцировка — в формулировке И.Л. Черткова). Во-вторых, стволовые клетки, в отличие от в значительной степени автономных опухолевых, находятся под управлением регуляторных систем организма и полностью подчинены его нуждам. Их пул и активность всецело зависят от текущих требований, которые предъявляет организму окружающая среда. В организме система управления и регулирования этими процессами достаточно устойчива в широком диапазоне значений сигналов среды. Но выход за пределы диапазона устойчивости управления, связанный с определенным сенсорным голодом и образом жизни, приводит к постоянному снижению, как количества, так и активности стволовых клеток. Это снижение во многом обратимо при возврате в устойчивый режим функционирования. Поэтому изучение управления количественными и качественными параметрами стволовых клеток in situ может оказаться одним из важных направлений в разработке здоровьесберегающих технологий.

Подробнее этот подход изложен на https://www.researchgate.net/profile/Alexander_Khalyavkin.

ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ АСИММЕТРИЧНЫХ ДЕЛЕНИЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРИМЕРЕ ОБРАЗОВАНИЯ ВЕРТИКАЛЬНЫХ ДЕЛЕНИЙ ПОЛУСТВОЛОВЫХ БАЗАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИНТЕРФОЛЛИКУЛЯРНОГО ЭПИДЕРМИСА

Александр Викторович Халывкин

Институт биохимической физики РАН и ФИЦ «Информатика и Управление» РАН, Москва, Россия

antisenesc@mail.ru

Известно, что стволовые клетки способны делиться как симметрично, так и асимметрично. В первом случае в результате деления возникает пара равноценных стволовых клеток, а во втором — стволовая клетка и клетка, приступающая к терминальной дифференцировке. Механизм выбора стволовой клеткой между симметричным и асимметричным делением до конца неясен. На наш взгляд прояснению ситуации может способствовать анализ феноменологии возникновения

симметричных и асимметричных делений среди полустоловых клеток базального слоя интерфолликулярных участков эпидермиса. Основное отличие этих клеток от фолликулярных стволовых базалоцитов только в том, что интерфолликулярные базалоциты специализированы к дифференцировке в одном направлении — только в плоские клетки роговых чешуек. При этом как стволовые, так и полустоловые клетки, не ушедшие в дифференцировку, потенциально способны к неограниченному размножению, поддерживая численность своего пула. Согласно данным литературы, изначально все деления базалоцитов симметричны. При этом известно, что адгезия к дермо-эпидермальной границе у базалоцитов, находящихся в разных стадиях цикла клеточного деления, существенно больше, чем у базалоцитов, находящихся в пролиферативном покое. Поэтому симметричное деление пролиферирующих полустоловых базальных клеток интерфолликулярного эпидермиса создает в нем определенное популяционное давление. Клеткам становится тесно в их нише, и это давление приводит к вытеснению некоторых клеток из базального слоя. Он всегда однослойный, в отличие от многослойных шиповатого, зернистого, зеркального и рогового слоев. Потому что утрата контакта с дермо-эпидермальной границей служит триггером старта процесса дифференцировки. При этом в дифференцировку вытесняются базалоциты, находящиеся в пролиферативном покое, поскольку их адгезия к дермо-эпидермальной границе значительно меньше, чем у пролиферирующих базалоцитов. Ситуативное повышение митотической активности эпидермиса приводит к положению, когда количество клеток базального слоя, находящихся в пролиферативном покое, резко падает. Нарастающее популяционное давление приводит к тому, что часть пролиферирующих клеток вынуждена менять ориентацию с горизонтальной (когда оба образующихся ядра еще не поделившейся клетки находятся в базальном слое) на вертикальную (когда одно ядро находится над другим). После окончания деления полустоловой клетки в такой ориентации, только одна из дочерних клеток утрачивает контакт с подложкой и приступает к дифференцировке.

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И СИТУАЦИИ «ПОСЛЕДНЕЙ НАДЕЖДЫ»: МОРАЛЬНЫЕ И ПРАВОВЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Светлана Анатольевна Хмелевская

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

xmelevsk@mail.ru

Регенеративная медицина находится на переднем крае науки, а это значит, что целый ряд разрабатываемых в ней способов лечения болезней еще не получил легальный статус разрешенных в клинической практике. Но для пациентов, находящихся в ситуации «последней надежды», когда традиционные методы лечения не эффективны, а болезнь прогрессирует, создавая реальную угрозу жизни (ситуации «serious conditions»), возможно, что именно среди экспериментальных методов будут те, которые предотвратят данную угрозу.

Ситуация «последней надежды» обостряет спектр этических и правовых проблем (среди них: мошенничество, когда под вывеской регенеративной медицины сомнительными структурами предлагаются «чудодейственные средства»; формирование — целенаправленное или спонтанное — завышенных ожиданий от достижений регенеративной медицины, что создает

ситуацию «ложной надежды»; проведение исследований повышенного риска на пациентах, находящихся в анализируемой ситуации и пр.).

Применяя новые методы лечения регенеративной медицины, исследователь/врач, не имея злонамеренного умысла, может оказаться вне правового «поля» по ряду причин: во-первых, регенеративная медицина развивается так быстро, что право не успевает дать адекватную юридическую оценку ее новым достижениям; во-вторых, существует правовой механизм, касающийся проведения научных исследований на людях, который не делает исключений для ситуаций «последней надежды»; в-третьих, увлеченность исследователя научным поиском может привести к недооценке рисков для жизни и здоровья пациента, что в дальнейшем чревато судебными разбирательствами и возможным привлечением к юридической ответственности.

В целях разрешения обозначенных проблем целесообразно: 1) закрепить нормами права условия обоснованного медицинского риска (наличие реальной угрозы жизни пациента вследствие его заболевания; неэффективность традиционных методов лечения при наличии других — экспериментальных эффективных методов лечения, устраняющих данную угрозу и пр.); 2) сформулировать правовое решение вопроса о применении методов регенеративной медицины в ситуации «serious conditions», например, как это реализовано в Руководстве «Expedited Programs for Regenerative Medicine Therapies for Serious Conditions» (Health Department of the U.S, 2019), в котором прописаны «serious conditions» (метастатический рак, запущенные формы возрастной макулярной дегенерации и пр.), а также алгоритм ускоренного получения легального одобрения на использование метода лечения или лекарства.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ИММУННЫХ МАРКЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ И ФИБРОЗОМ

Ирина Викторовна Холоденко¹, Роман Васильевич Холоденко², Леонид Константинович Курбатов¹, Гарик Ваганович Манукьян³, Константин Никитич Ярыгин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии им. Б.В. Петровского», Москва, Россия

irkhol@yandex.ru

Иммунomodулирующие свойства мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из различных тканевых источников, известны давно. Иммунomodуляция осуществляется мезенхимными клетками как за счет паракринных механизмов, так и за счет экспрессии или отсутствия экспрессии ряда иммунных маркеров на поверхности МСК. Мы провели сравнительный транскриптомный анализ экспрессии иммунных маркеров,

которые потенциально могут опосредовать иммуномодулирующие свойства мезенхимных стволовых клеток, выделенных из биоптатов печени пациентов с фиброзом и циррозом. Исходя из иммунофенотипа печеночных МСК, можно предположить, что эти клетки обладают иммуносупрессивными свойствами, как и большинство МСК, полученных из других источников. Отсутствие экспрессии МНС II класса на поверхности печеночных МСК свидетельствует о том, что эти клетки являются низкоиммуногенными. С другой стороны, эти клетки, на высоком уровне экспрессируют человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) А, В и С, и β 2-микроглобулин, и, следовательно, могут быть мишенью для цитотоксических Т-клеток. Исходя из наших данных, печеночные МСК не экспрессируют костимуляторных молекул (CD80, CD86 и др.) и иных белков, которые могут индуцировать иммунный ответ. Печеночные МСК экспрессируют такие регуляторные молекулы, как CD46 и CD55, участвующие в инактивации белков C3b и C4b комплемента, и CD59, блокирующий белок комплемента C9, что может свидетельствовать о наличии в этих клетках защитного механизма от системы комплемента. Кроме того, печеночные МСК на значительном уровне экспрессируют CD112, который проявляет дуалистичную функцию по отношению к Т-клеткам. В зависимости от рецептора, с которым связывается этот белок, может происходить активация или ингибирование Т-клеточного ответа. Печеночные МСК экспрессируют PD-L1 (CD274), лиганд, который при взаимодействии с рецептором (PD1), приводит к ингибированию иммунного ответа. Уровни экспрессии CD55 и CD274 были выше в клетках, выделенных из фиброзной печени, что может свидетельствовать о более высоких иммуносупрессивных свойствах этих МСК по сравнению с МСК, выделенными из цирротической печени.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 г. и при поддержке гранта РФФИ № 18-29-01029.

ЛИМБАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КАК КОМПОНЕНТ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ РОГОВИЦЫ

Юлия Игоревна Хорольская, Ольга Игоревна Александрова, Галина Алексеевна Писугина, Кирилл Эдуардович Журенков, Дарья Александровна Переплетчикова, Татьяна Вячеславовна Машель, Наталья Аркадьевна Михайлова, Миральда Ивановна Блинова

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

juliya_khorolskaya@mail.ru

В настоящее время для целого ряда офтальмологических патологий не существует оптимальных методов лечения, что приводит к низкой эффективности терапии и росту инвалидизации пациентов. Поэтому встает вопрос о разработке альтернативных подходов к исследованию заболеваний и их терапии. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области представляются клеточные технологии.

При различных патологиях переднего отрезка глазного яблока часто развивается синдром лимбальной недостаточности, возникающий в результате дисфункции, повреждения или гибели лимбальных стволовых клеток

(ЛСК), которые обеспечивают обновление и восстановление эпителия роговицы. Существуют различные подходы для лечения синдрома лимбальной недостаточности и восстановления целостности роговицы, однако не всегда удается добиться восстановления поврежденных тканей при помощи традиционных методов, поэтому встает вопрос о разработке клеточных продуктов, способных компенсировать потерю функциональности ЛСК и направленных на восстановление целостности роговицы.

При разработке тканеинженерных конструкций для восстановления функциональности лимба и роговицы рассматриваются различные источники клеточного компонента. В настоящее время, наиболее подходящим клеточным компонентом таких конструкций считают ЛСК, однако целый ряд сложностей при получении аутологичного материала и острая нехватка донорского материала накладывают ограничения на их применение в регенеративной медицине. Одним из наиболее перспективных источников клеточного материала представляются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПК), направленные в дифференцировку по типу ЛСК. ЛСК, полученные из ИПК, могут открыть новые перспективные подходы не только в регенеративной офтальмологии, но и при создании различных моделей офтальмологических патологий и разработке тест-систем.

ЛСК были получены из ИПК человека в бессывороточных условиях, без использования ксеногенных компонентов, что является важным условием применения клеточных продуктов в регенеративной медицине. Полученная популяция была охарактеризована по основным стволовым маркерам и маркерам дифференцировки, а также показана возможность создания тканеинженерных конструкций с использованием ЛСК из ИПК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90146. Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 19-34-90146.

МЕТОДЫ НЕИНВАЗИВНОЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПОЛУЧАЕМЫХ МАТРИКСОВ И АНАЛИЗА ПРОЦЕССОВ ИХ БИОРАЗЛОЖЕНИЯ

Елена Александровна Храмова¹, Егор Степанович Мороков¹, Тимофей Евгеньевич Григорьев², Вадим Моисеевич Левин¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

alyonushk@gmail.com

В связи с бурным развитием и внедрением регенеративной медицины в рутинную медицинскую практику, возникает существенная потребность в разработке новых полимерных материалов, которые бы позволили решить широкий спектр задач по восстановлению поврежденных и утраченных органов. Особой задачей здесь является прогнозирование возможного поведения матрикса и влияния его физических свойств на пролиферацию и миграцию клеток в зависимости от типа формирования и используемого полимера. Для решения этой задачи перспективным является метод неинвазивной ультразвуковой визуализации высокого разрешения. Данная методика позволяет не только в значительной степени снизить трудоемкость анализа полученных образцов матрикса, но и обеспечивает высокую достоверность

информации о внутреннем строении и физических свойствах матриксов. С помощью ультразвуковой микроскопии неинвазивно в оптически непрозрачных матриксах были определены их следующие структурные особенности: направление и распределение волокон, неоднородность толщины волокон в нетканых материалах, наличие полостей, заполненных жидкостью, обнаружение воздушных пузырьков при их смачивании, неравномерность распределения наполнителя в композитных материалах, степень пористости в губчатых и гидрогелевых матриксах, вариации плотности. В процессе получения децеллюляризованных тканей и органов, с помощью ультразвуковой микроскопии установлено влияние протокола децеллюляризации на физические свойства полученного внеклеточного матрикса и эффективность применяемого протокола для удаления клеточной составляющей. Показана эффективность описываемого метода для анализа измененной структуры в композитных матриксах в процессе гидролитической деструкции. Полученные данные подтверждены методами классической гистологии и электронной микроскопии.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 17-03-01361.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ АДИПОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ЛИПОАСПИРАТА

Наталья Игоревна Храмова, Сергей Александрович Плаксин, Артем Юрьевич Соцков

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

renelve@gmail.com

В зависимости от цели различают два подхода к подготовке липоаспираата: для реконструкции и увеличения мягких тканей предпочтительным является максимальное содержание жизнеспособных адипоцитов, тогда как регенеративная подразумевает наличие предшественников фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток.

Наше исследование включило 57 образцов жира («macrofat») 19 здоровых женщин в возрасте $38,7 \pm 11,6$ лет, аспирированных методами классической, водоструйной и шприцевой липэктомии, окрашенных 0,25% трипановым синим. Средняя жизнеспособность адипоцитов составила 59%, варьируя от 0% до 100% даже в одном образце. Минимальная жизнеспособность адипоцитов наблюдалась в жире, собранном из молочной железы в случае гинекомастии, и в одном образце «сухой» шприцевой липэктомии — до 100% нежизнеспособных адипоцитов. Минимальная жизнеспособность адипоцитов также коррелировала с большим количеством эритроцитов.

У одного пациента 92% адипоцитов были нежизнеспособными через 3 часа после операции. В 4 образцах через 12 часов до 80% адипоцитов были жизнеспособными. Через 24 часа 5 образцов имели неокрашенные адипоциты в центре конгломерата жира, что может указывать как на жизнеспособность клеток, так и на недостаточное проникновение красителя.

При сравнении различных методик липоаспирации установлено, что число жизнеспособных адипоцитов было выше при водоструйной и шприцевой липосакции (среднее количество — 65%), ниже — при классической (55%), однако разница была незначительной ($p=0,05$).

Доля жизнеспособности адипоцитов в зависимости от участков сбора жира был следующим: голень — 76%

(20–98%), спина — 67% (30–100%), живот — 57% (0–98%), ягодицы — 50%, плечи — 38% (15–61%), колени — 35% (50–80%).

Количество жизнеспособных клеток в абдоминальной области 6 образцов липоаспираата в 10, 20 и 30 проходах через фильтр 1,4 мм составило соответственно 70%, 66% и 64% адипоцитов и 28%, 26% и 24% фибробластоподобных клеток. При проходах через фильтр 1,2 мм — 52%, 46%, 42% адипоцитов и 24%, 24%, 16% фибробластоподобных клеток. При пассажах через эмульсифицирующий «нано» фильтр — 16%, 12% и 4% адипоцитов и 16%, 16%, 6% фибробластоподобных клеток.

Количество жизнеспособных клеток значительно не уменьшалось после каждого из 30 пассажей. Оно значительно уменьшалось только при смене фильтра. Максимальное повреждение нанес «нано» фильтр: жизнеспособные клетки, как адипоциты, так и фибробластоподобные клетки, уменьшились уже после первого пассажа.

МОРФОМЕТРИЯ АДИПОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ АНАТОМИЧЕСКИХ ЗОН

Наталья Игоревна Храмова, Сергей Александрович Плаксин, Артем Юрьевич Соцков

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

renelve@gmail.com

Один из этапов обработки липоаспираата — фильтрация. Для расчета оптимальных характеристик фильтров необходимо знать диаметры адипоцитов и количество адипоцитов в конгломератах. Кроме того, жировая ткань является активным эндокринным органом. Увеличенный размер жировых клеток называется гипертрофией и проявляется метаболической дисфункцией, инсулинорезистентностью, дислипидемией и аномальной секрецией адипокинов.

Проанализировано 103 образца липоаспираата, взятых из различных анатомических зон у 50 здоровых женщин в возрасте $41,4 \pm 12,1$ год, с индексом массы тела $24,3 \pm 3,6$ кг/м². Липоаспираат содержал жизнеспособные адипоциты в нативных мазках, выполнено 8469 измерений.

Конгломераты адипоцитов состояли из 10–250 клеток в зависимости от диаметра канюли при заборе и применения анаэробных фильтров.

Диаметры адипоцитов измеряли в продольном и поперечном направлениях относительно ячеек камеры Горяева, имеющих диаметр 50 мкм, расчетная погрешность измерений составила 8,9 мкм.

Форма адипоцитов в мазках была не сферической, а неправильной, многоугольной или овальной.

Диаметр адипоцитов варьировал от 15,91 до 180,72 мкм, в среднем составив $62,6 \pm 21,6$ микрометра (медиана — 59,4), доверительный интервал 95% — 61,8–62,8 микрометра. Минимальный — 15,7, максимальный — 180,8 микрометра.

Диаметр адипоцитов слабо коррелировал с массой тела ($R=0,07$; $p=0,0001$), чуть сильнее — с индексом массы тела ($R=0,12$; $p=0,0001$). Также обнаружена слабая обратная корреляция диаметра адипоцитов с возрастом ($R=-0,08$; $p=0,0001$) и ростом ($R=-0,04$; $p=0,004$).

Диаметр адипоцитов в различных областях в среднем равнялся: бедра — $61,9 \pm 18,3$ мкм; живот — $59,4 \pm 19,0$ мкм; колени — $62,2 \pm 23,2$ мкм; подлопаточная область — $57,7 \pm 16,3$ мкм; поясница — $56,5 \pm 18,0$ мкм; плечо — $63,5 \pm 19,8$ мкм; ягодицы — $57,2 \pm 14,5$ мкм.

Для определения изменения диаметров адипоцитов при их хранении мы проанализировали 14 образцов жира в течение 24 часов после липоаспирации и 2 образца в течение 2 дней. Липоаспират хранился в плотно закрытых шприцах в физиологическом растворе при комнатной температуре. Тест на жизнеспособность с помощью витального окрашивания трипановым синим был положительным для 50% клеток. В 5 из 16 случаев размеры адипоцитов были меньше исходных с диапазоном колебаний в пределах 10 мкм ($p < 0,0001$). В 3 случаях на следующий день и в 1 случае через 2 дня диаметры существенно не изменились. В 6 случаях на следующий день и в 1 пробе через 2 дня диаметры адипоцитов стали больше, в пределах 10 микрометров ($p = 0,007$).

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ФИЛЬТРАЦИИ ЛИПОАСПИРАТА

Наталья Игоревна Храмова, Артем Юрьевич Соцков, Сергей Александрович Плаксин, Наталия Ивановна Гуляева

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

sozkov1998a@mail.ru

Регенеративный потенциал жировой ткани определяется количеством жизнеспособных клеток стромально-васкулярной фракции, объемный эффект — числом жизнеспособных адипоцитов. Один из этапов подготовки липоаспирата — его фильтрация. Известно, что каждый из пассажей липоаспирата через анаэробный фильтр значимо не снижает жизнеспособности клеток. Однако степень повреждения клеток при переходе от фильтра к фильтру достаточно не изучена.

Нами изучено 6 образцов липоаспирата, взятых из абдоминальной области у здоровых женщин. Для фильтрации жира поочередно применялись анаэробные клеточные фильтры 1,4 мм, 1,2 мм и эмульсифицирующий фильтр, содержащий сетку («нанопорный»). Каждые 10 пассажей тонким слоем наносились мазки липоаспирата, которые затем фиксировались ацетоном и окрашивались гематоксилином и эозином. Степень повреждения клеток оценивалась для адипоцитов и фибробластоподобных клеток (морфологически имеющих структуру фибробласта).

Число разрушенных адипоцитов при применении фильтра 1,4 мм каждые 10 пассажей составило 4%, 8% и 12%, фибробластоподобных клеток — 0%, 0% и 2% соответственно. В мазках определялись неповрежденные фибробластоподобные клетки, находящиеся среди элементов соединительной ткани, и адипоциты, у части из которых отмечалась фрагментация цитоплазмы. Количество эритроцитов уменьшалось пропорционально числу пассажей.

При использовании фильтра 1,2 поврежденные адипоциты обнаружены в количестве 20%, 26% и 26%, поврежденные фибробластоподобные клетки — 4%, 6% и 6% соответственно при каждом из 10 пассажей. Фибробластоподобные клетки находились преимущественно среди соединительнотканых тяжей, последние при увеличении числа пассажей постепенно теряли целостность клеточной структуры. У части фибробластоподобных клеток была нарушена целостность клеточной структуры. Наибольшая степень повреждения определялась у отдельно лежащих адипоцитов, меньшая — в клеточных конгломератах. Эритроциты в мазках практически не встречались.

Применение эмульсифицирующего («нано») фильтра привело к значительному разрушению адипоцитов до 56%, 58% и 78%, фибробластоподобных клеток — до 10%, 14% и 12% соответственно каждые 10 пассажей. Морфологически определялись разрушение ядер клеток с образованием внутриядерных вакуолей и конденсация хроматина в разрушающихся ядрах клеток. Определялись единичные остатки волокон соединительной ткани, большую часть мазка занимал гомогенный жир.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ НА МОДЕЛИ ИПСК-КАРДИОМИОЦИТОВ: ФОКУС НА GSK3В КИНАЗУ

Александр Александрович Худяков¹, Анастасия Константиновна Зайцева^{1,2}, Ксения Игоревна Перепелина^{1,3}, Константин Олегович Гусев⁴, Полина Евгеньевна Клаузен^{1,3}, Алексей Валерьевич Карпушев¹, Алексей Николаевич Томилин⁴, Анна Борисовна Малашичева^{1,2,4}, Анна Александровна Костарева¹

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;*

⁴ *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;*

² *Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

khudyakov_aa@almazovcentre.ru

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) — гетерогенное заболевание, проявляющееся нарушениями сердечного ритма и развитием сердечной недостаточности. На молекулярном уровне заболевание характеризуется нарушением структуры вставочных дисков, состоящих из более двухсот белков, среди которых белки десмосом, ионные каналы и сигнальные белки. Существуют данные о том, что ингибиторы GSK3В киназы способны предотвращать развитие АКМП на животных моделях, однако детальные молекулярные механизмы этого эффекта остаются неизученными.

Целью исследования являлось изучение молекулярных механизмов АКМП и тестирование различных подходов к восстановлению функции кардиомиоцитов, нарушенной при заболевании.

В ходе исследования использовались линии iPSC от пациента с АКМП, являющегося носителем двух мутаций в гене плакофиллина-2 и линии iPSC от здорового донора. iPSC дифференцировали в кардиомиоциты методом модуляции сигнального пути Wnt. Потенциалчувствительные натриевые токи регистрировали, используя стандартную технику фиксации потенциала на мембране. Для оверэкспрессии PKP2 и GSK3В кардиомиоциты трансдуцировали лентивирусными частицами. Для ингибирования GSK3В кардиомиоциты обрабатывали малыми молекулами SB216763 и CHIR99021.

Было показано, что кардиомиоциты от пациента с АКМП обладают пониженной экспрессией PKP2, а также пониженной активностью сигнального пути Wnt/ β -catenin по сравнению с контрольными iPSC-СМ. Электрофизиологические исследования выявили значительное снижение плотности натриевого тока в кардиомиоцитах пациента с АКМП (в $5,6 \pm 1,7$ раза). Трансдукция кардиомиоцитов пациента с помощью лентивирусов, несущих PKP2 дикого типа, приводила к восстановлению натриевого тока и активности сигнального

пути Wnt/b-catenin. Ингибирование GSK3B киназы в кардиомиоцитах пациента приводило к полному восстановлению натриевого тока в кардиомиоцитах пациента, в то время как оверэкспрессия конститутивно активной формы GSK3B вызывала снижение натриевого тока в контрольных клетках.

Таким образом, было показано, что мутации в гене *PKP2*, ассоциированные с АКМП, приводят как к нарушению активности сигнальных путей, так и к нарушению электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов, что указывает на взаимосвязь этих процессов. Было показано, что GSK3B играет важную роль в регуляции активности сигнального пути Wnt/b-catenin и плотности натриевого тока.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (18-315-0017719) и РНФ (19-75-00070).

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ЭПИКАРДА ПОСЛЕ ИНФАРКТА

Зоя Ивановна Цоколаева^{1,2}, Константин Владимирович Дергилев², Мария Александровна Болдырева², Анастасия Валерьевна Комова², Елена Викторовна Парфенова²

¹ *Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия;*

² *ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия*

Tsokolaevazoya@mail.ru

Многочисленные исследования указывают на значимую роль эпикарда в формировании клеток-предшественниц и митогенных сигналов, контролирующих развитие и репарацию сердца, что делает его потенциальной мишенью для терапевтического воздействия. Однако идентификация прогениторных клеток эпикарда (ПКЭ) и изучение механизмов их активации крайне затруднены в связи с анатомическими особенностями расположения сердца и необходимостью использования соответствующих трансгенных животных. В связи с этим разработка метода визуализации ПКЭ является актуальной задачей.

Цель исследования: разработать метод визуализации прогениторных клеток эпикарда.

Методы. В работе использованы мыши линии C57Bl6. Для визуализации клеток эпикарда в полость перикарда вводили 20 мкл красителя PKH26, инкубировали 5 мин., затем удаляли перикард с помощью операционных ножниц. Инфаркт миокарда моделировали путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии. Визуализацию маркеров ПКЭ проводили на криосрезах с использованием метода иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты. Показано, что введение в полость перикарда флуоресцентного красителя PKH26 с последующей кратковременной инкубацией и снятием перикарда способствует внесению флуоресцентной метки в эпикардальный слой клеток. В неповрежденном миокарде PKH26⁺ клетки эпикарда сохраняют жизнеспособность, межклеточное взаимодействие на основе плотных контактов (E-кадгерин, ZO1) и низкий уровень пролиферации. После инфаркта миокарда происходит «разобщение» эпикардального слоя клеток, утолщение субэпикардальной области, содержащей пролиферирующие PKH26⁺ клетки. Часть меченных ПКЭ мигрируют в нижележащие слои миокарда и экспрессируют маркеры гладкомышечных клеток и фибробластов.

Таким образом, введение флуоресцентного красителя PKH26 в полость перикарда позволяет визуализировать клетки эпикарда и их производные как в отсутствие повреждения, так и после инфаркта, что может быть использовано для изучения их функций и разработки терапевтических средств таргетного воздействия на эпикард.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-15-00384, РФФИ № 18-015-00438.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ МИКОПЛАЗМ В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Александр Андреевич Чапленко

ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва, Россия

a.a.chaplenko@yandex.ru

Оценка микоплазменной контаминации — важный этап контроля качества клеточных линий, используемых при производстве биомедицинских клеточных продуктов. Предложенные в ГФ XIV методы анализа: микробиологический (культуральный) и цитохимический (индикаторной клеточной культуры) выполняются в течение нескольких суток, сложно стандартизируются, а их результат субъективно интерпретируется оператором. Альтернативные молекулярно-генетические методы анализа, наиболее широко используемым из которых является ПЦР, отличаются экспрессностью, однако менее чувствительны.

Для достижения предела обнаружения микоплазмы, соответствующего фармакопейным требованиям, в проводили предварительное концентрирование испытуемых образцов — суспензий клеточной линии DF-2, 3×10^5 кл./мл (соответствует примерному содержанию клеток в продуктах клеточной терапии), в которые внесены микроколичества микоплазм *M. arginini* и *A. laidlawii*. Концентрирование проводили одним из двух способов: центрифугированием при 12000g (для осаждения клеток микоплазм) с последующим отбрасыванием супернатанта или центрифугальной ультрафильтрацией с использованием концентрата VivaSpin 6 100 kDa. Согласно полученным данным, каждый из предложенных способов концентрирования образцов обеспечивает надежную детекцию при их содержании, равном 10 КОЕ/мл.

В качестве ключевых валидационных параметров аналитических методик детекции посторонних примесей, нормируемых по пределу содержания (к которым относятся, в т.ч. микоплазмы), в соответствии с ГФ XIV и ЕР 9.0, рассматривают «Специфичность» и «Предел обнаружения». Специфичность методик ПЦР-детекции микоплазм определяется селективностью связывания праймеров, входящих в тест-системы и валидируется на стадии разработки таких наборов.

Предел обнаружения (LOD) методик ПЦР-анализа невозможно оценить по соотношению «сигнал-шум», поскольку сигнал холостого образца отсутствует. Подходом, позволяющим избежать подобного выбора, является вероятностный способ оценки предела обнаружения. Как было показано ранее, вероятность детекции аналита в образце методом ПЦР в концентрациях, близких к пределу обнаружения описывается функцией распределения Пуассона. Таким образом, можно принять LOD равным концентрации, обнаруживаемой с заданной статистически значимой вероятностью (95%).

Предел обнаружения *M. arginini* в клеточных линиях с использованием разработанной методики, таким образом, составил 6,95 КОЕ/мл, *A. laidlawii* — 3,95 КОЕ/мл. Оба значения удовлетворяют требованиям EP, USP и ГФ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЯ ИЗ БИОМАТЕРИАЛА ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

Сергей Валерьевич Чеботарёв, Владимир Васильевич Хоминец, Лидия Ивановна Калюжная, Алексей Сергеевич Гранкин, Артем Владимирович Барабанов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Chebotarev-sergei@rambler.ru

Введение. Лечение травматических повреждений суставного гиалинового хряща представляет большую проблему в ортопедии из-за особенностей его строения. Эффективной терапевтической стратегии, приводящей к восстановлению нативного хряща в настоящее время нет, к тому же существующие методы требуют открытых операций и осуществляются в несколько этапов. В последнее десятилетие инъекционные гидрогели стали перспективными биоматериалами, в значительной степени благодаря биосовместимости, структурной схожести внеклеточного матрикса, отличной проницаемости для клеток и возможности использования в виде минимально-инвазивных процедур. Вартонов студень представляет собой твердую слизистую ткань, окружающую сосуды пуповины и состоящую из внеклеточного матрикса и мезенхимальных клеток. Внеклеточный матрикс имеет схожее строение с матриксом гиалинового хряща, представленное коллагенами разных типов, гликопротеинами, протеогликанами, каждый из компонентов рассматривается, как терапевтический агент для регенеративной медицины.

Цель. Экспериментально доказать эффективность гидрогеля из Вартонова студня пуповины в лечении травматического повреждения гиалинового хряща.

Материалы и методы. В исследование включено 12 кроликов породы шиншилла. Всем животным был сформирован костно-хрящевой дефект нагружаемой зоны медиального мыщелка правой бедренной кости. Первой группе животных (7 особей) в полость оперированного сустава трехкратно вводили 0,4 мл 0,9% раствор натрия хлорида, аналогично второй группе (5 особей) 0,4 мл — гидрогель из биоматериала пуповины. Спустя 60 суток всем животным выполнено МРТ коленных суставов с оценкой глубины и диаметра сформированного дефекта.

Результаты. Средний диаметр дефекта в первой и второй группах составил 3,2 и 2,8 мм соответственно. Средняя глубина в первой и второй группах составил 3,0 и 2,7 мм соответственно. Обнаружено статистически значимое увеличение размеров дефекта в группе, леченной физраствором, и достоверное уменьшение глубины дефекта в группе, леченной гидрогелем пуповины ($p < 0,05$). Нами не было выявлено каких-либо осложнений при интраартикулярном введении гидрогеля из биоматериала пуповины.

Вывод. Бесклеточный матрикс Вартонова студня пуповины, использованный в виде инъекционного гидрогеля и введенный в полость травмированных коленных суставов кроликов к 60 суткам после повреждения приводит к частичному уменьшению глубины и площади моделированных дефектов суставного хряща.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СИРОЛИМУСА, ПАКЛИТАКСЕЛЯ И ДИКЛОФЕНАКА ПРОТИВ ПЕРВИЧНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Борис Павлович Челобанов^{1,2}, Вера Сергеевна Черноносова^{1,3}, Алена Олеговна Степанова^{1,3}, Мария Васильевна Харьковская¹, Андрей Анатольевич Карпенко³, Павел Петрович Лактионов^{1,3}

¹ *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;*

² *ФГАОУВО Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;*

³ *ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия*

boris.p.chelobanov@gmail.com

Рестеноз стентированного сегмента артериальной стенки — ключевая проблема эндоваскулярной хирургии. Использование стентов сосудов с лекарственным покрытием (ССЛП) (как правило, на стенты наносят препараты ряда лимусов или паклитакселя, обладающие цитотоксическим и иммуномодуляторным действием) не позволило существенно улучшить эффективность стентирования по данным последних рандомизованных многоцентровых исследований. Одной из причин низкой эффективности ССЛП может являться использование некорректных доз препаратов и неэффективной системы их доставки в сосудистую стенку.

В представленной работе исследована цитотоксичность обычно наносимых на стенты препаратов — сиролимуса (СЛ) и паклитакселя (ПТК), а также предлагаемых для покрытия стентов НПВС диклофенака (ДФ). Исследование выполнено на первичных клетках человека — эндотелиоцитах из пупочной вены (HUVEC), гладкомышечных клетках (SMC) из сонной артерии, фибробластах из ткани десны (GF), а также на трансформированных клетках линий HeLa и HepG2.

ДФ вплоть до концентрации 10 мкг/мл не оказывает цитотоксического действия на клетки HeLa и HepG2, а начиная с 25 мкг/мл жизнеспособность клеток резко снижается достигая 50% при 50 мкг/мл. Первичные клетки были более устойчивы к действию ДФ — жизнеспособность SMC и GF сохраняется на уровне 60–70% при концентрации 200 мкг/мл, HUVEC сохраняли такую же жизнеспособность при концентрации 100 мкг/мл.

ПТК ингибирует пролиферацию HUVEC с 0,5 нг/мл, а при 5 нг/мл на 50%. Для клеток HeLa и GF аналогичные эффекты наблюдаются при в 10 раз более высоких концентрациях ПТК. HepG2 и SMC замедляли рост при 5 нг/мл, однако гибель 50% клеток наблюдается при концентрации 500 нг/мл.

Цитотоксический эффект СЛ наблюдается при концентрации 1 нг/мл, однако повышение концентрации до 2 мкг/мл не приводит к существенному снижению жизнеспособности которая остается на уровне 60–70% для HUVEC, GF, HeLa, и на уровне 80–90% для HepG2 и SMC.

Полученные данные демонстрируют более высокую устойчивость к цитостатикам медленно пролиферирующих первичных клеток (особенно GF и SMC). Поскольку SMC являются основным источником роста неоинтимы и рестеноза полученные данные позволят оптимизировать требуемую дозу препаратов в покрытиях стентов.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 18-15-00080 и частично Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013–2020 № АААА-А17-117020210026-2.

ВЛИЯНИЕ МАТРИКСА ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ НА ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК ДЕРМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ТРЕХМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ

Элина Сергеевна Чермных^{1,2}, Екатерина Павловна Калабушева^{1,2}, Егор Олегович Осидак³, Сергей Петрович Домогатский^{3,4}, Сергей Владимирович Крашенинников⁵, Сергей Иванович Белоусов⁵, Екатерина Андреевна Воротеяк^{1,2,6}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва, Россия;

² НИИ Трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³ ООО фирмы ИМТЕК, Москва, Россия;

⁴ Лаборатория иммунохимии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

⁵ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

⁶ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

elinachermnykh@mail.ru

В последнее время биомеханическим характеристикам тканеинженерных конструкций уделяется все больше внимания при изучении механизмов клеточной дифференцировки, патогенеза различных заболеваний или стимуляции регенерации тканей. Механическое воздействие биополимерного матрикса, из которого в конечном счете создается тканеинженерная конструкция и, в котором находятся клетки, может оказывать существенное влияние на их поведение. Клетки воспринимают и преобразовывают механические сигналы в биохимические и могут придавать матриксу новые свойства. Значительный прогресс достигнут в исследовании поведения клеток в коллагеновом матриксе низкой плотности, однако поведение клеток внутри плотного коллагенового матрикса остается мало изученным. Между тем, применение биополимерных матриксов высокой плотности, изготовленных из коллагена, в тканеинженерных конструкциях представляет большой интерес, поскольку из них можно создавать стабильные и масштабируемые объемные структуры, в том числе методом 3D биопечати, для дальнейшего клинического применения.

Целью работы является установить, как различия в механике матрикса влияют на поведение клеток дермы человека при *in vitro* культивировании в трехмерном коллагеновом матриксе. Для изготовления биополимерного матрикса использовали коллаген I типа (Viscoll®, ООО фирмы «Имтек», Россия). Клетки дермы кожи культивировали в коллагеновых гелях, жесткости которых варьировали путем изменения концентрации коллагена I типа. Исследовали различия по выживаемости и пролиферативной активности клеток в зависимости от жесткости матрикса. Также изучили зависимость морфологии и динамики дермальных клеток от жесткости матрикса с помощью цейтраферной съемки. Первичные результаты свидетельствуют о том, что клетки дермы человека сохраняют высокую жизнеспособность и пролиферативную активность в коллагеновом геле высокой плотности. Скорость передвижения клеток в коллагеновом гидрогеле и проходимая дистанция снижается при повышении концентрации коллагена

с 5 до 10 мг/мл, однако при дальнейшем увеличении концентрации коллагена до 40 мг/мл — не изменяется. Скорость расплывания клеток снижается по мере повышения плотности матрикса.

Совместное применение биофизических подходов и методов клеточной биологии позволит определить механикопрочностные характеристики получаемых конструкций и их влияние на клеточную активность в составе тканеинженерных конструкций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04060.

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У ЖИВОТНЫХ С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ DYSF

Ольга Николаевна Чернова¹, Михаил Олегович Мавликеев¹, Андрей Павлович Киясов¹, Роман Вадимович Деев^{2,3}

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

olgachernova92@yandex.ru

Известно, что большое количество белков сарколеммы ответственны за репарацию мышечных волокон (МВ). Одним из таких белков является дисферлин, кодируемый геном *DYSF*. При мутации в этом гене регенеративная способность мышечных волокон снижается, что приводит к атрофии и некрозу мышц. У человека мутации в гене *DYSF* сопровождаются слабостью и атрофией скелетных мышц преимущественно таза и нижних конечностей, что приводит к развитию дисферлинопатий. Для изучения данной группы наследственных заболеваний выделен ряд линейных животных с мутацией в каузальном гене. Одной из таких линий являются мыши линии Bla/J.

Целью исследования стала патоморфологическая оценка репаративного рабдомиогенеза у мышей линии Bla/J.

Материалы и методы. В медиальную головку правой икроножной мышцы всем животным вводили 100 мкл 0,1% раствора новокаина 16 мышам линии Bla/J (экспериментальная группа) и 16 мышам линии C57Bl/6 (контрольная группа). Выведение животных осуществляли на 2, 4, 10 и 14 сутки после инъекции. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, иммуногистохимически с антителами к α -ГМА, Ki67, миогенину, тяжелым цепям быстрого и медленного миозинов. Морфометрия срезов была произведена в программе ImageJ (NIH, США).

В ходе исследования были изучены процессы репаративной регенерации: альтерация, пролиферация, дифференцировка и ремоделирование скелетных мышц. Доля некротизированных МВ была достоверно выше у мышей линии Bla/J до 14 сут. (7,4(5,4; 9,9)% против 2,5(1,5; 3,1)%). Индекс пролиферации в мышечных клетках и инстерситии снижался в обеих группах со 2 по 14 сут., однако был ниже у мутантных мышей, что говорит о более низкой пролиферативной активности скелетных мышц в условиях отсутствия дисферлина. Доля миогенин-позитивных ядер оставалась на более

низком уровне у животных с мутацией в гене *DYSF*, что может быть обусловлено снижением регенераторного потенциала скелетных мышц в течение миодистрофии. Доля соединительной ткани была достоверно выше в экспериментальной группе на всех изучаемых сроках, однако не превышала 0(0,1;0,8)%. Показатели сосудистой плотности и индекса пролиферации эндотелиоцитов оставались ниже у мышей линии Bla/J, что подтверждает описанное в литературе участие дисферлина в ангиогенезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Казанского (Приволжского) федерального университета.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИУРЕТАНОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Вера Сергеевна Черноусова^{1,2}, Александр Александрович Гостев², Иван Сергеевич Мурашев², Андрей Анатольевич Карпенко², Павел Петрович Лактионов^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

vera_mal@niboch.nsc.ru

Важными свойствами материалов используемых для изготовления протезов сосудов являются био- и гемосовместимость, стабильность структуры в процессе эксплуатации. В представленной работе исследованы свойства комбинированных материалов, изготовленных методом электроспиннинга из растворов полиуретанов (ПУ) Tecoflex EG-80A (Tec) и Pellethane 2363-80A (Pel) с белками в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Для улучшения адгезии эндотелиоцитов и их предшественников в матрицы вводили желатин, для улучшения гемосовместимости — бивалирудин. По данным сканирующей электронной микроскопии все материалы имели волокнистую структуру (диаметр волокон $1,12 \pm 0,44 \div 1,39 \pm 0,6$ мкм, размер пор $3,6 \pm 1,3 \div 5,8 \pm 2,7$ мкм). Было показано, что соотношение ПУ и белка в растворе для электроспиннинга влияет на механические свойства матриксов. Наилучшими механическими свойствами обладали материалы, изготовленные из 5% Тес с добавлением 15% желатина и 3,5% Pel с добавлением 5–10% желатина (вес/объем, вес/вес).

Биосовместимость материалов на основе ПУ была исследована в экспериментах *in vitro* с использованием эндотелиальных клеток человека и Alamar Blue реагента. Показано, что клетки эффективнее адгезируют и пролиферируют на матриксах на основе Тес по сравнению с матриксами на основе Pel. Обнаружено, что введение желатина в состав матриксов приводит не только к улучшению связывания эндотелиальных клеток, но и к повышенному связыванию клеток крови с поверхностью матриксов. Добавление бивалирудина в состав матриксов, не оказывает влияния на связывание эндотелиоцитов, но и препятствует адгезии клеток крови.

Протезы сосудов на основе ПУ и контрольные протезы из e-PTFE были имплантированы в брюшную аорту крыс на срок до 6 месяцев. Данные обзорной микроскопии и УЗИ-исследования свидетельствуют

об увеличении толщины неоинтимы в протезах из e-PTFE через 3 и 6 месяцев функционирования по сравнению с протезами на основе ПУ. Данные гистологического и иммуногистохимического исследования демонстрируют, что протезы сосудов из e-PTFE более подвержены кальцификации и обрастают парапротезной тканью, а внутренняя поверхность протезов на основе ПУ более плотно заселена эндотелиоцитами (экспрессия Factor VIII). Таким образом, протезы на основе ПУ с добавлением биополимеров могут быть рекомендованы для дальнейших клинических исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-75-30090 и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013–2020 № AAAA-A17-117020210026-2.

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ГОРМОНОТЕРАПИИ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРОЛИКА

Михаил Витальевич Черноуцкий, Ольга Викторовна Волкова, Михаил Николаевич Калинин, Майя Борисовна Белякова, Наталья Валериевна Костюк, Михаил Владимирович Миняев

ФГБОУ ВО «Тверской Государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Россия

michail1911@mail.ru

Дифференцировка клеток *in vitro* в остеогенном направлении зависит не только от условий пребывания в культуре, но и исходного состояния организма — донора клеток. В данной работе сравнивали способность к дифференцировке в остеогенном направлении мультипотентных клеток жировой ткани от животных, длительно получавших стероидный гормон, и от обычных доноров.

Кроликов делили на две группы: контрольные и опытные (внутримышечные инъекции дексаметазона по 0,2 мл/кг, 21 день). Извлеченные с соблюдением биоэтики экспланты жировой ткани в течение двух недель культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением BS, после чего фрагменты ткани извлекали. Далее часть культур была индуцирована в остеогенном направлении (индуцирующая смесь: β -глицерофосфат + аскорбиновая кислота + дексаметазон). Состояние культур оценивали путем микроскопирования нативных препаратов, потерю липидных включений фиксировали окраской Oil Red O, выявление очагов минерализации проводили с помощью ализаринового красного.

Во всех случаях популяция мигрирующих из эксплантов клеток состояла преимущественно из выраженных адипоцитов — крупных сферических клеток, заполненных жировыми каплями. По мере культивирования они активно теряли жировые включения, приобретая фибробластоподобную форму. В популяции клеток от контрольных животных морфологического разнообразия до индукции нами отмечено не было. В популяции клеток от опытных животных при длительном культивировании отмечены области высокой плотности, склонные к депонированию кальция, что подтверждалось окраской ализариновым красным. Большой интерес представляли многочисленные крупные, широкораспластанные клетки с несколькими ядрами и секреторными вакуолями, предположительно остеокласты, которые формировали

стабильную популяцию на протяжении нескольких месяцев. Примечательно, что индуцированные на остеогенез клетки от контрольных животных демонстрировали более гетерогенную морфологию, в которой также встречались крупные многоядерные клетки, однако продолжительность их жизни в культуре составляла всего около 10 дней. При окраске степень минерализации внеклеточного матрикса менее выражена, чем в опытном образце.

В данной работе впервые показано, что дедифференцированные клетки жировой ткани, полученные от животного с предшествующей гормонотерапией интенсивно и стойко дифференцируются в остеогенном направлении.

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КРОВЕНОСНЫХ КАПИЛЛЯРОВ МИОКАРДА МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ

Елена Александровна Чернявская

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

elena_chernyavskaya@ukr.net

Ожирение — патологическое состояние организма, основным компонентом которого является избыточное накопление жира, приводящее к увеличению массы тела. Наиболее распространенной формой является алиментарное ожирение (АО). Особый интерес представляет возможность коррекции функциональных нарушений при АО с помощью препаратов, полученных из кордовой крови, которая является уникальной субстанцией с разнонаправленной биологической активностью.

Целью было изучить особенности изменений ультраструктуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых и старых крыс с АО на фоне введения ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК).

Исследования выполнены на белых 6- и 24-месячных беспородных крысах-самцах. Каждая возрастная группа была разделена на 3 подгруппы: контрольные крысы; крысы с АО; крысы с АО, которым вводили ЯСК КК. Моделирование АО осуществляли по методике В.Г. Баранова. Размороженный препарат ЯСК КК человека вводили внутривентриально, однократно в дозе 3×10^5 CD34⁺ кл./кг веса животных. Животных выводили из эксперимента путем декапитации на следующие сутки и через месяц после введения ЯСК КК, производя забор кусочков ткани миокарда для электронно-микроскопического исследования.

Показано, что в ультраструктуре органелл эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда как молодых, так и старых контрольных крыс развивается митохондриальная недостаточность. Изменения ультраструктурной организации эндотелиальных клеток контрольных животных с моделью АО свидетельствуют о развитии катаболических процессов, что подтверждалось деструкциями мембран гранулярной эндоплазматической сети, редукцией пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи, а также появлением включений липидов и вторичных лизосом в цитоплазме.

На следующие сутки после введения ЯСК КК в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров миокарда животных двух возрастных групп наблюдалась слабо

выраженная активация трансцеллюлярного транспорта веществ, воды и электролитов. Это проявлялось увеличением числа микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда. В более отдаленные сроки эксперимента (через месяц после воздействия) было выявлено повышение активности метаболических и репаративных процессов, что подтверждалось увеличением количества рибосом, полисом и гранул гликогена, а также уменьшением включений липидов и липофусцина. Наиболее выражены данные изменения были отмечены у старых 24-месячных животных.

НАРУШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К НОРАДРЕНАЛИНУ В ИММОТАЛИЗОВАННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Вадим Игоревич Чечехин, Анастасия Михайловна Иванова, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Вероника Юрьевна Сысоева, Наталья Игоревна Калинина

МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

v-chech@mail.ru

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль во многих процессах, включая поддержание гомеостаза жировой ткани. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и нейромедиаторами, одним из ключевых является норадреналин. Ранее в нашей лаборатории в МСК был найден феномен гетерологической сенситизации альфа1А-адренорецепторов, который связан с переключением с цАМФ на кальций-зависимую внутриклеточную сигнализацию, что ведет к повышению чувствительности МСК к норадреналину. Ранее схожий механизм был обнаружен только в эмбриональных клетках. Также было показано, что соотношение между субпопуляциями МСК, экспрессирующих адренергические рецепторы, варьируется от донора к донору. Из-за высокой гетерогенности первичных МСК дальнейшее исследование сигнальных механизмов адренергической регуляции требует популяции с более однородной экспрессией адренорецепторов. Для этого мы решили использовать охарактеризованную линию иммортализованных МСК, полученных из жировой ткани (hTERT-МСК).

В данной работе мы сравнивали чувствительность линейных hTERT-МСК и первичных МСК к норадреналину, а также способность этих клеток к регуляции чувствительности к катехоламинам. С помощью иммунофлуоресцентного анализа мы показали, что hTERT-МСК экспрессируют все типы адренорецепторов. И в первичных МСК, и в линии hTERT-МСК, преобладали α 1А-адренорецепторы. Анализ с помощью точечной цитометрии показал, что процент линейных клеточек, содержащих различные изоформы адренорецепторов, был довольно стабильным, но ниже по сравнению с первичными культурами. При исследовании чувствительности hTERT-МСК к норадреналину мы продемонстрировали, что ответ был ниже в 4 раза по сравнению с первичными МСК. При этом вариабельность ответа в hTERT-МСК была сходной с первичной культурой. Ранее мы показали, что первичные МСК отвечают на норадреналин через α 1- и α 2-адренорецепторы, а hTERT-МСК отвечают только через α 1-адренорецепторы. Исследуя феномен

гетерологической сенситизации у hTERT-MCK, мы показали, что у данной культуры отсутствовала регуляция чувствительности к норадреналину, в отличие от первичной культуры, что вызвано сниженным потенциалом линейных клеток к синтезу сAMP.

Таким образом, hTERT-MCK по сравнению с первичными MCK проявляют ослабленную способность реагировать на норадреналин, а также регулировать чувствительность к данному гормону.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-80018.

АНАЛИЗ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ РОДСТВЕННОГО ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕГО ЛИГАНДА (TRAIL)

Дарья Сергеевна Чулпанова, Севиндж Камаловна Клетухина, Лейсан Газинуровна Тазетдинова, Альберт Анатольевич Ризванов, Валерия Владимировна Соловьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

solvovovavv@gmail.com

Практически все клетки человека высвобождают внеклеточные везикулы (ВВ) — это окруженные мембраной сферические микро- и наноструктуры, отделяющиеся от клетки и участвующие в межклеточной коммуникации. ВВ представляют собой перспективный инструмент для доставки биоактивных молекул в терапевтических целях. Одним из перспективных цитокинов с противоопухолевой активностью является родственный фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL), способный избирательно вызывать гибель опухолевых, но не здоровых, клеток организма. Идеальным типом клеток для получения ВВ являются мезенхимные стволовые клетки (МСК), поскольку они способны мигрировать в опухолевые ниши. Причем, выделенные из МСК ВВ сохраняют эту способность родительских клеток.

В настоящей работе МСК человека были выделены из жировой ткани человека и трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом, кодирующим кДНК гена TRAIL (MCK-TRAIL) или гена дальнего красного флуоресцентного белка Katushka-2S (MCK-Katushka-2S). Сверхэкспрессия TRAIL была подтверждена ПЦР-РВ и вестерн блот анализом. Экспрессия Katushka-2S оценивалась с помощью флуоресцентной микроскопии. Из МСК были выделены ВВ, размер которых составил 50–200 нм в диаметре. Иммунофенотипический анализ показал, что полученные ВВ несут маркеры MCK CD44, CD90 и CD105, однако экспрессия CD29 и CD73 была значительно снижена. Для оценки влияния ВВ из нативных и генетически модифицированных МСК на пролиферативную активность и жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, 5×10^4 клеток культивировались совместно с 20 мкг/мл ВВ из нативных МСК, MCK-Katushka-2S или MCK-TRAIL в течение 24 часов. Пролиферативная активность SH-SY5Y после культивирования с ВВ из MCK-TRAIL снизилась на $12,85 \pm 0,51\%$ процентов по сравнению с пролиферативной активностью SH-SY5Y, культивированных в отсутствие ВВ.

Число живых клеток SH-SY5Y было существенно ниже ($68,03 \pm 1,54\%$) после культивирования с ВВ из MCK-TRAIL по сравнению с клетками, которые культивировались без ВВ ($86,6 \pm 0,82\%$), с ВВ из нативных МСК ($83,6 \pm 0,46\%$) и MCK-Katushka-2S ($82,48 \pm 1,12\%$).

Из полученных данных можно сделать вывод, что использование MCK-TRAIL может быть эффективно в терапии онкологических заболеваний. Однако, требуются дальнейшие исследования эффективности MCK-TRAIL на животных моделях опухолей in vivo.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 18-74-10044 и Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНА 2

Дарья Сергеевна Чулпанова, Валерия Владимировна Соловьева, Светлана Сергеевна Архипова, Марина Олеговна Гомзикова, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Альберт Анатольевич Ризванов

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия

daryachulpanova@gmail.com

Терапия высокими дозами интерлейкина 2 (ИЛ2) является эффективной при лечении рака почки и метастатической меланомы. Однако системное введение больших доз ИЛ2 может быть токсичным, вызывая синдром утечки капилляров и стимулируя регуляторные Т-клетки. Одной из стратегий снижения системной токсичности ИЛ2 предложено использовать в качестве вектора мезенхимные стволовые клетки (МСК) со сверхэкспрессией данного цитокина. МСК проявляют тропизм к опухолевым нишам, таким образом, являясь идеальным вектором для целевой доставки противоопухолевых агентов.

В настоящей работе МСК, выделенные из жировой ткани человека, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим кДНК гена ИЛ2 (MCK-ИЛ2) или синего флуоресцентного белка (MCK-BFP). Экспрессию ИЛ2 подтверждали с помощью ПЦР-РВ и вестерн блот анализом. Было показано, что жизнеспособность, иммунофенотип и пролиферативная активность MCK-ИЛ2 статистически не отличались от нативных МСК и MCK-BFP. С помощью мультиплексного анализа показано, что секреция таких цитокинов как CX3CL1, CXCL6, IL8, CCL13, CCL15 и CCL20 была значительно снижена в MCK-ИЛ2, однако секреция TNF- α была в 1,5 раза выше в MCK-ИЛ2 по сравнению с нативными МСК и MCK-BFP. Также обнаружено увеличение экспрессии генов VEGF, MMP2 и TGF- β 1 в MCK-ИЛ2 по сравнению с нативными МСК. Влияние MCK-ИЛ2 на жизнеспособность опухолевых клеток было неоднозначным. Пролиферация клеток SH-SY5Y значительно увеличивалась при культивировании в кондиционированной среде (КС) от MCK-ИЛ2. Однако пролиферация SH-SY5Y снижалась более чем на 20% после совместного культивирования с MCK-ИЛ2 по сравнению с контрольными ко-культурами. Число апоптотических и некротических клеток SH-SY5Y также немного увеличилось после культивирования с MCK-ИЛ2 по сравнению с контролем. Число поздних активированных Т-клеток, натуральных киллеров (NK-клеток), NKT-клеток и активированных Т-киллеров

увеличилось после культивирования в КС от МСК-ИЛ2, по сравнению с КС от нативных МСК.

Таким образом, показано, что МСК-ИЛ2 могут подавлять пролиферативную активность клеток SH-SY5Y и активировать иммунные клетки. Однако опосредованный экспрессией ИЛ2 терапевтический эффект может быть нивелирован повышенной экспрессией про-онкогенов VEGF, MMP2 и TGF- β и естественной способностью МСК стимулировать прогрессию некоторых опухолей. Потенциальный про-онкогенный эффект МСК-ИЛ2 требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01133 и Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

ТРЕХМЕРНЫЕ КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ: ОЦЕНКА МИГРАЦИИ КЛЕТОК НА ПЛАСТИКОВОЙ, КОЛЛАГЕНОВОЙ И МАТРИКСНОЙ ПОДЛОЖКАХ

Евгения Юрьевна Шабалина, Екатерина Юрьевна Сорова, Елена Владимировна Петерсен

Лаборатория волновых процессов, Московский физико-технический институт, Москва, Россия

evgenyashb@mail.ru

Двумерные (2D) клеточные модели — это простой, быстрый и экономически эффективный метод исследования клеточных реакций на лекарственные соединения и/или внешние раздражители, однако все чаще обсуждаются его ограничения. [1–2] Клетки в среде 3D-культуры морфологически и физиологически отличаются от клеток в среде 2D-культуры и по поведению больше похожи на клетки *in vivo* [3]. При очевидном преимуществе 3D моделей до сих пор нет четких критериев оценки эффективности функционирования клеток в 3D условиях, позволяющих проводить скрининг 3D культур. Одна из характеристик опухолевых клеток — это миграция или инвазивный рост. Очевидно, что для клеток данные показатели будут варьироваться в зависимости от выбранных подложек, изучение чего и было целью данной работы.

Из клеточной линии A549, представляющей собой карциному легкого человека, были созданы сфероиды методом силиконовых микромолдов. Диаметр сфероидов на 6 день культивации составлял 80 μ м. Сфероиды высаживались на подложки трех различных типов: культуральный пластик, коллагеновый гель концентрацией 1 мг/мл и стерильный децеллюляризованный матрикс, представляющий собой срез крысиного легкого толщиной 15 μ м. Сфероиды окрашивались витальным ядерным красителем Hoechst 33342, высаживались на подложки и наблюдались в течение 12 часов.

Самая быстрая скорость миграции клеток из тела сфероида наблюдалась в случае коллагеновой подложки: 65% относительно первоначального радиуса за 4 часа. Сфероиды на пластике отличались более плавным ростом (38% за 4 ч), однако к 10 часам радиус зоны миграции клеток на пластике стал равен радиусу зоны миграции клеток на коллагене (92%). В случае сфероидов, высаженных на матрикс, клетки начали мигрировать на 2 часа позже клеток на коллагене и пластике (6 ч). Миграция клеток на матриксе (50% за 8 ч, 97% за 12 ч) сравнима с миграцией по пластику (56% за 8 ч, 104% за 12 ч), однако имеет свои особенности.

Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 18-15-00391).

Литература:

1. Birgersdotter A., Sandberg R., Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro*—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin. Cancer Biol.* 2005; 15: 405–12.
2. Bhadriraju K., Chen C.S. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov. Today* 2002; 7: 612–20.
3. Baharvand H., Hashemi S.M., Kazemi Ashtiani S., Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. *Int. J. Dev. Biol.* 2006; 50: 645–52.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ α -И β -СУБЪЕДИНИЦЫ β -ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А ЧЕЛОВЕКА И АНАЛИЗ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ В СОСТАВЕ ГЕННО-КЛЕТочНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ТЕЯ-САКСА

Алиса Алмазовна Шаймарданова, Дарья Сергеевна Чулпанова, Валерия Владимировна Соловьева, Альберт Анатольевич Ризванов

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

aliceshaimardanova@mail.ru

Болезнь Тея-Сакса является наследственным заболеванием, относящимся к группе лизосомных болезней накопления. Данное заболевание характеризуется недостаточностью фермента β -гексозаминидазы А (HexA) вследствие различных мутаций в гене α -субъединицы данного фермента, в результате чего происходит накопление GM2 ганглиозидов внутри лизосом преимущественно нервных клеток, что ведет к острой нейродегенерации. Характерными особенностями болезни Тея-Сакса являются мышечная слабость, атаксия и другие проблемы с движением, речевые проблемы и психические расстройства. На сегодняшний день заболевание остается неизлечимым.

В настоящей работе разработан экспрессионный плазмидный лентивирусный вектор rLX303-HEXA-P2A-HEXB, содержащий гены, кодирующие α и β субъединицы фермента HexA, разделенные саморасщепляющимся P2A пептидом. Полученной плазмидой rLX303-HEXA-P2A-HEXB проведена генетическая модификация клеток HEK293T. Ферментативную активность в кондиционированной среде трансцицированных клеток HEK293T исследовали через 48 часов после трансфекции с применением флуоресцентных субстратов MUG и MUGS. Показано, что общая активность HexA в клетках, трансфицированных плазмидой rLX303-HEXA-P2A-HEXB клетках увеличивается на 35%, а активность α субъединицы в 10 раз. Вестерн-блот анализ лизатов генетически модифицированных клеток HEK293T показал наличие выраженной полоски, соответствующей ожидаемой молекулярной массе α и β субъединиц фермента HexA.

Далее с использованием плазмиды rLX303-HEXA-P2A-HEXB получали рекомбинантный лентивирус LV-HEXA-P2A-HEXB. Полученным лентивирусом проводили генетическую модификацию (трансдукцию) мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК) человека, после чего, генетически модифицированные МКПК-HEXA-P2A-HEXB внутривенно вводили лабораторным крысам линии Вистар. После введения МКПК-HEXA-P2A-HEXB, в плазме крови крыс

отмечалось увеличение активности α субъединицы β -гексозаминидазы А. Наиболее высокая активность детектировалась на 6–9 сутки после введения.

Таким образом, актуально дальнейшее исследование терапевтической эффективности и безопасности МКПК со сверхэкспрессией НехА для возможной разработки новых методов генно-клеточной терапии болезни Тея-Сакса. Использование МКПК в качестве векторов для доставки недостающего фермента НехА актуально благодаря возможности данных клеток преодолевать гематоэнцефалический барьер и оказывать также трофическую функцию для предотвращения нейродегенерации.

ФОРМИРОВАНИЕ АПАТИТОПОДОБНЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ В УСЛОВИЯХ ВАРЬИРУЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Евгения Петровна Шалина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

shalina@mail.ru

В широком спектре материалов, используемых для восстановления дефектов костной ткани, предпочтение отдается изучению различным модификациям фосфатов кальция (ФК), среди которых широкое применение нашел гидроксиапатит (ГА). Основными преимуществами его использования является хорошая биосовместимость и остеоинтеграция с костной тканью, но применение имплантов на основе ГА в регенеративной медицине менее перспективно в сравнении с другими ФК, которые обладают остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами. ФК обладающие схожей кристаллической структурой с ГА такие как октакальцийфосфат и кальцийдефицитный гидроксиапатит (ДГА) могут самостоятельно обеспечить быстрое формирование новой костной ткани при помещении их в дефект, но получение таких материалов затруднительно ввиду нестабильности их структур при нагреве.

Длительная выдержка высокотемпературной модификации трикальцийфосфата (ТКФ) в буферных системах дает возможность трансформировать исходный материал в ДГА в интервале температур 25–37°C согласно пути $\text{ТКФ} \rightarrow \text{ОКФ} \rightarrow \text{ДГА} \rightarrow \text{ГА}$ при времени выдержки на каждом этапе не менее 168 ч. Увеличение температуры способствует увеличению скорости прямой реакции, но так же приводит к протеканию побочных, результатом которых являются менее биосовместимые ФК.

Изменение параметров проведения процесса трансформации за счет увеличении температуры проведения процесса до 100–200°C и одновременного изменения давления в системе позволяет уменьшить количество стадий получения апатитоподобных структур и сокращает время получения материала до трех часов.

Проведено исследование влияния состава различных буферных растворов и температуры проведения процессов трансформации при постоянном повышенном давлении на фазовый состав и микроструктуру конечного материала. Показано, что проведение процессов в интервале температур 100–200 °C приводит к формированию структур на основе апатитоподобной фазы, которые не могут быть получены при проведении стандартной высокотемпературной термообработки. Имплантаты на основе полученного ФК имеют мелкокристаллическую

структуру, что значительно увеличивает удельную поверхность, и может значительно отразиться на биологических свойствах за счет максимально схожего химического состава к биологическому ГА.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-33-20258 мол_а_вед). Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075–00746–19–00.

ФОРМИРОВАНИЕ АПАТИТОПОДОБНЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ В УСЛОВИЯХ ВАРЬИРУЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Евгения Петровна Шалина, Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

ev.shalina@mail.ru

В широком спектре материалов, используемых для восстановления дефектов костной ткани, предпочтение отдается изучению различным модификациям фосфатов кальция (ФК), среди которых широкое применение нашел гидроксиапатит (ГА). Основными преимуществами его использования является хорошая биосовместимость и остеоинтеграция с костной тканью, но применение имплантов на основе ГА в регенеративной медицине менее перспективно в сравнении с другими ФК, которые обладают остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами. ФК обладающие схожей кристаллической структурой с ГА такие как октакальцийфосфат и кальцийдефицитный гидроксиапатит (ДГА) могут самостоятельно обеспечить быстрое формирование новой костной ткани при помещении их в дефект, но получение таких материалов затруднительно ввиду нестабильности их структур при нагреве.

Длительная выдержка высокотемпературной модификации трикальцийфосфата (ТКФ) в буферных системах дает возможность трансформировать исходный материал в ДГА в интервале температур 25–37°C согласно пути $\text{ТКФ} \rightarrow \text{ОКФ} \rightarrow \text{ДГА} \rightarrow \text{ГА}$ при времени выдержки на каждом этапе не менее 168 ч. Увеличение температуры способствует увеличению скорости прямой реакции, но так же приводит к протеканию побочных, результатом которых являются менее биосовместимые ФК.

Изменение параметров проведения процесса трансформации за счет увеличении температуры проведения процесса до 100–200°C и одновременного изменения давления в системе позволяет уменьшить количество стадий получения апатитоподобных структур и сокращает время получения материала до трех часов.

Проведено исследование влияния состава различных буферных растворов и температуры проведения процессов трансформации при постоянном повышенном давлении на фазовый состав и микроструктуру конечного материала. Показано, что проведение процессов в интервале температур 100–200 °C приводит к формированию структур на основе апатитоподобной фазы, которые не могут быть получены при проведении стандартной высокотемпературной термообработки. Имплантаты на основе полученного ФК имеют мелкокристаллическую структуру, что значительно увеличивает удельную поверхность, и может значительно отразиться

на биологических свойствах за счет максимально схожего химического состава к биологическому ГА.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 18-33-20258 мол_а_вед). Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075–00746–19–00.

ПОИСК НОВЫХ ИЗОФОРМ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF), ОБЛАДАЮЩИХ НЕЙРОНАЛЬНЫМИ ИНДУКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Джиргала Владимировна Шамадыкова^{1,3}, Анастасия Александровна Чулкова², Екатерина Анатольевна Савченко³, Галина Валериевна Павлова¹⁻³

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³ ООО «АПТО-ФАРМ», Москва, Россия

djirgala04@gmail.com

Целью данного исследования является поиск новых изоформ глиального нейротрофического фактора, обладающих нейрональными индукторными свойствами.

Методы. Исследование проводилось на культурах клеток PC12, цельных и диссоциированных эмбриональных нейросферах мыши. Культуры клеток культивировали в присутствии ранее неизвестных изоформ глиального нейротрофического фактора (GDNF), названных 47, 62 и 63. В качестве контроля использовали среду, не содержащую исследуемые изоформы mGDNF. Нейроиндукторные свойства изоформ mGDNF оценивали методом иммуноцитохимического окрашивания клеток на β 3-тубулин и подсчета длины β 3-тубулин позитивных нейрональных отростков, сформировавшихся после 6 дней культивирования модельных клеточных систем в присутствии исследуемых изоформ mGDNF.

Результаты. Обнаружено, что одна из исследуемых форм mGDNF, обозначенная 47, обладает нейроиндукторными свойствами и стимулирует образование β 3-тубулин позитивных отростков в клетках, выбранных моделями *in vitro*. Эффективность образования отростков при использовании кондиционной среды, содержащей 47 форму, достоверно превышала результат в контроле в два раза на уровне статистической значимости 5%. Кондиционные среды, содержащие изоформы 62 и 63, не отличались по своей эффективности от контроля.

Заключение. При анализе клеточных культур эукариот, экспрессирующих GDNF, постоянно обнаруживаются бенды с подвижностью отличной от ожидаемой расчетной. Можно предположить, что подобная картина с множественными бендами наблюдается и *in vivo*, а малые изоформы белка GDNF обладают нейроиндукторными свойствами, стимулируют нейрональную дифференцировку стволовых и (или) прогениторных клеток и способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Результаты исследования обнаруженных изоформ на клеточных моделях *in vitro* показали, что из трех пептидов, 47 обладала заметными нейротрофическими свойствами и стимулировала формирование нейрональных отростков. Эти результаты говорят о необходимости проведения дальнейших исследований.

Таким образом, настоящая работа ориентирована на рассмотрение возможности применения пептидов,

с аминокислотной последовательностью отличной от конвенциональной формы GDNF, в качестве альтернативы. На данном этапе исследования есть возможность надеяться на перспективность подхода, связанного с получением новых изоформ глиального нейротрофического фактора, сохраняющих функциональную активность нативного GDNF с целью решения проблемы доставки GDNF в головной мозг.

Работа поддержана программой Президиума РАН МКБ

НОВЫЙ ПОДХОД К ПРОФИЛАКТИКЕ НЕЭСТЕТИЧЕСКИХ РУБЦОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КУЛЬТУРЫ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Елена Юрьевна Шаповалова, Татьяна Анатольевна Бойко, Юрий Геннадиевич Барановский, Николай Петрович Барсуков, Марина Николаевна Морозова, Алексей Геннадиевич Барановский

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия

shapovalova_l@mail.ru

Проблема формирования неэстетических рубцов после операционных вмешательств на лице и шеи, негативно воспринимаемых пациентами, остается актуальной, несмотря на применение прецизионной операционной техники и использования подходящего шовного материала (А.Е. Белоусов, 2005; В.О. Mofikoua et al., 2012). Оптимизация заживления и профилактика формирования неэстетичных рубцов челюстно-лицевой области путем трансплантации в свежую операционную рану аллогенных дермальных фибробластов рассматривается как один из способов разрешить эту проблему.

Материал и методы. Были прооперированы 26 человек с образованиями, расположенными на коже лица и шеи, которые можно было сравнить с симметричными участками здоровой стороны. У пациентов 1 группы ($n=14$) перед сшиванием в края раны вводили тоннельным способом суспензию культуры аллогенных дермальных фибробластов. Проводилось определение площади формирующихся рубцов с применением программы «LesionMeter» и выполнялась кожная термография термоиндикаторными пленками фирмы CelluVision Personal фирмы IPS Milan – Italy.

Результаты. Показатели молодого рубца на 30-е сутки после операции позволяют констатировать, что введение клеточной культуры аллогенных дермальных фибробластов в края ран оказывает положительное влияние на скорость заживления операционных ран, снижение воспалительной реакции и способствует развитию отличающей в положительную сторону по качеству и функциональным признакам рубцовой ткани. К 30-м суткам площадь первичной хирургической раны сократилась на 67,69% и у 71,43% пациентов образовались мягкие и тонкие эстетические рубцы с микроциркуляцией, не отличимой от окружающей кожи и кожи симметричных участков лица или шеи. У пациентов контрольной группы без трансплантации фибробластов площадь уменьшилась всего на 50,00% и эстетические рубцы сформировались только в 41,67% случаев. У 16,67% пациентов было констатировано присутствие широких плотных холодных за счет слабой васкуляризации гипотрофических

рубцов. Вокруг таких рубцов сохранилась гипертермия, свидетельствующая о слабой воспалительной реакции.

Заключение. Использование суспензии клеточной культуры аллогенных дермальных фибробластов в терапии послеоперационных ран снижает частоту развития воспалительных реакций, стимулирует процессы заживления и способствует развитию более функционально и эстетически приемлемых рубцов в области лица и шеи.

ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ КРЕМНИЯ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Нина Валерьевна Шаронова¹, Римма Алексеевна Полтавцева², Виктор Юрьевич Тимошенко³, Владимир Александрович Олейников^{3,4}, Елена Викторовна Свирщевская⁴

¹ *Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова. Москва, Россия;*

² *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;*

³ *Инженерно-физический институт биомедицины НИЯУ «МИФИ», Москва, Россия;*

⁴ *ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

ninavsharonova@yandex.ru

Кремний является вторым по распространенности элементом на Земле после кислорода. Известно, что до 90% кремния в организме содержится в костной и соединительной тканях, а также в кожных покровах, лимфатических узлах, волосах и цитовидной железе. Введение кремния в коленные и тазобедренные суставы может восстанавливать нормальную структуру суставной сумки за счет стимуляции собственных стволовых клеток. Как альтернатива возможно введение в сустав мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Целью данной работы был анализ влияния кристаллического кремния (Si) и оксида кремния (SiO₂) на дифференцировку МСК. Наночастицы кремния (SiNPs) получали ультракороткой абляцией лазером Yb:KGW твердотельных мишеней в атмосфере инертного газа. Размер полученных частиц составил 10–30 нм (средний диаметр 25 нм), что определяли методом трансмиссионной микроскопии. Частицы SiNPs представляли собой кристаллический кремний, покрытый оболочкой толщиной 1–2 нм окисленного кремния. В качестве сравнения использовали диоксид кремния Аэросил (АС). Суспензию частиц АС получали ультразвуковой обработкой в воде. Размер частиц АС также составил около 20–30 нм. МСК получали из Вартонова студня на 2–3 пассаже культивирования. МСК культивировали в присутствии SiNPs или АС 12 и 21 сутки без и с добавлением остеогенных или хондрогенных факторов дифференцировки. Определяли количество клеток в культуре и экспрессию поверхностных маркеров МСК CD 13, 73, 90, 105, 146 и молекул МНСI, МНСII классов методом проточной цитометрии. Остеогенную, хондрогенную и адипогенную дифференцировку подтверждали на 21 сутки окраской ализарином, сафронином и масляным красным соответственно. Анализ фенотипа МСК показал,

что сами наночастицы не влияли на экспрессию маркеров МСК. Под действием дифференцировочных факторов как АС, так и SiNPs стимулировали экспрессию CD13 в 3–4 раза и не влияли на экспрессию остальных маркеров. Также АС и SiNPs стимулировали формирование 3D структур при остеогенной дифференцировке эффективнее, чем только дифференцировочные факторы. Таким образом, кремний в любой форме стимулирует как остеогенную, так и хондрогенную дифференцировку, что может быть использовано для регенерации суставов и костей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00171).

ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ ЛИНИИ ARPE-19

Елена Валерьевна Шафеи, Юлия Петровна Новикова, Мария Анатольевна Александра

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

elenamallakhova@gmail.com

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) может служить источником для восстановления сетчатки человека при её повреждениях. Так, у низших позвоночных ПЭС способен восстанавливать функциональную сетчатку после ретинозктомии. При этом клетки ПЭС дедифференцируются до так называемых «stem-like» клеток, пролиферируют и затем заново дифференцируются по двум направлениям: в нейроны сетчатки и ПЭС. Ключевым фактором при этом является основной фактор роста фибробластов (оФРФ). При повреждениях глаза человека клетки ПЭС также начинают дедифференцироваться и пролиферировать, но направленной нейральной дифференцировки не происходит. Учитывая консервативность основных сигнальных путей и развития глаза в ряду позвоночных, мы предполагаем, что можно стимулировать направленную трансдифференцировку ПЭС человека для восстановления элементов сетчатки.

Цель работы — изучение регенеративных возможностей пигментного эпителия сетчатки человека на примере линии ARPE-19.

В работе использовали линию ПЭС человека ARPE-19. Трансдифференцировку ПЭС стимулировали 50% кондиционированной средой (КС) регенератов сетчатки тритона и оФРФ. Оценивали изменение морфологии, влияние на дифференцировку и пролиферацию. Как оФРФ, так и КС регенератов сетчатки тритона способствовали трансдифференцировке клеток ПЭС в нейральном направлении. Об этом свидетельствовала потеря клетками окраски на эпителиальный маркер Сх43 на 2 сутки, снижение экспрессии маркеров ПЭС (MITF) и повышение экспрессии маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, KLF4) на 3 сутки. Со 2 суток наблюдалось приобретение окраски на маркер ранней нейральной дифференцировки βIII-тубулин и повышение уровня его экспрессии на 5 сутки, что коррелирует со снижением экспрессии маркера плюрипотентности (OCT4). Под действием оФРФ в культуре на 5 сутки появлялись клетки с аксоноподобными отростками. Под действием КС в культуре ПЭС происходило формирование сферических клеточных агрегатов (на сроке 2 суток) с последующим выходом клеток из них (на сроке 5 суток). Среди вышедших из агрегатов

клеток присутствовали клетки с длинными отростками. оФРФ оказывал стимулирующее воздействие на пролиферацию клеток ПЭС (повышалась на 20%). КС, наоборот, подавляла пролиферацию, и этот уровень зависел от первоначальной посадочной концентрации. Таким образом, исследование показало, что клетки ПЭС человека могут быть трансдифференцированы в нейральном направлении для восстановления элементов сетчатки.

Работа выполнена в рамках госзадания № 0108-2019-0004.

СОЗДАНИЕ ШТАММА КРЫСИНЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD105 ЧЕЛОВЕКА

Ольга Александровна Шашкова, Илья Валерьевич Смирнов, Агния Александровна Пиневиц, Наталья Левоновна Вартанян, Марина Платоновна Самойлович, Владимир Борисович Климович

ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

ujinolga@yandex.ru

Эндоглин (CD105) — гликопротеин, высоко экспрессированный на активированном эндотелии. Его рассматривают как мишень для выявления ангиогенеза в опухолях.

Целью работы было создание клеточной модели, предназначенной для испытания на животных препаратов антител, направленных против эндоглина человека.

Методом ретровирусной трансдукции создали клетки крысиной глиомы С6, экспрессирующие CD105 человека. Для селекции клеток использовали пурамицин. Эффективность получения постоянной линии, обозначенной С6-hL-Eng, оценивали методом проточной цитофлуориметрии, с помощью созданных в лаборатории меченых флуоресцеином антител против CD105 человека.

Наибольшая эффективность трансдукции достигалась при добавлении к вирусным частицам полибрена в концентрации 8 мкг/мл. Режим нарастания концентрации пурамицина от 1,5 до 10 мкг/мл при селекции не сказывался на результате получения клеток С6-hL-Eng. Через 52 дня селекции отобрали одну из культур, содержащую 99,5% CD105⁺ клеток, которые по критерию интенсивности флуоресценции представляли единую популяцию. Одну часть этих клеток в течение следующих 2 месяцев продолжали культивировать в присутствии пурамицина, а вторую культивировали без него. При выращивании клеток на антибиотике сохранялись исходные характеристики штамма. В культурах без пурамицина к концу срока количество CD105⁺ клеток осталось неизменным, однако появилась минорная популяция клеток с низкой экспрессией эндоглина.

Для оценки туморогенности клетки С6-hL-Eng культивировали 3 суток без пурамицина и затем в дозе 6 млн. прививали подкожно белым аутобредным крысам. Контролем служили клетки глиомы С6. Через 7 суток в местах инъекции клеток вырастали опухоли. Экспрессию CD105 на опухолях, образованных из клеток С6-hL-Eng, подтверждали иммуногистохимически. Рост опухоли из клеток С6-hL-Eng сопровождался появлением в крови крыс растворимого эндоглина человека, который выявляли с помощью ИФА.

Таким образом, создана биологическая модель, которая представляет постоянную линию клеток глиомы крыс, экспрессирующую эндоглин человека и при прививке

животным образующую CD105⁺ опухоли. Эта модель позволяет проводить испытания препаратов антител, направленных против эндоглина человека.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕГЕНЕРИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ В ЛЕЧЕНИИ НЕСРАЩЕНИЙ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ

Константин Васильевич Шевырев, Геннадий Алексеевич Оноприенко, Виктор Парфентьевич Волошин, Дмитрий Владимирович Мартыненко, Сергей Александрович Ошкуков, Евгений Викторович Степанов

ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

skv-moniki@yandex.ru

В ортопедо-травматологическом отделении МОНИКИ в период 2013–2019 годы наблюдалось 192 пациента с посттравматическими дефектами длинных костей. Для успешного оперативного лечения у исследуемых больных, кроме решения механической задачи — выполнения стабильного остеосинтеза, выполнялась пластика костных дефектов. Применение костезамещающих регенерируемых материалов определялось необходимостью повысить местный регенераторный потенциал за счет остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств трансплантатов. Сегментами имплантации являлись: плечевая кость — 110 случаев, бедренная кость — 52, предплечье — 11, кости голени — 19. Использовался спектр регенерируемых пластических материалов. Ауто-трансплантаты из гребня подвздошной кости (блоки и чипсы) у 140 пациентов, костные чипсы и блоки «Остеоматрикс», Россия в 18 случаях, биокерамика — 15 случаев, губчатые блоки и спонгиозная крошка Lyoplast, Россия у 12 пациентов, «Коллост», Россия — 7 случаев. В случаях, когда интраоперационно удавалось получить полноценный контакт между костными фрагментами применение регенерируемых материалов определялось их остеоиндуктивными свойствами. При неполном контакте из-за краевого дефекта костных фрагментов требовалось применения регенерируемых материалов, обладающих не только остеоиндуктивными, но и остеокондуктивными свойствами. В ряде случаев при наличии сегментарного дефекта кости использовался структурный сегментарный трансплантант из костезамещающего материала, обладающего высокими остеоиндуктивными свойствами. Всем пациентам проводился рентгенологический контроль динамики сращения костей через 2, 4, 6, 8 месяцев (в более поздние сроки по показаниям) после операции. В сомнительных случаях пациентам выполнялась компьютерная томография с шумоподавлением от металла в сроки от полугода после операции. Сращение в течение двух лет после остеосинтеза несросшейся кости констатировано у 189 больных, что составило 98,4%. Рентгенологически динамика сращения и замещение дефектов происходила в сроки от 6 месяцев у пациентов, перенесших ауто-трансплантацию кости. Костные дефекты, замещенные ксено- и аллотрансплантатами, замещались более длительно. В отдельных случаях по данным рентгенографии и компьютерной томографии перестройка костных губчатых кортикальных ксенотрансплантатов не наблюдалась в сроки более года после операции. В трех случаях при повторных ревизионных вмешательствах через 10 и более месяцев после операции в ране обнаруживались не измененные, не связанные с тканями ксенотрансплантаты.

ТЕСТИРОВАНИЕ СИСТЕМ CRISPR/CAS НА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ КРЫСЫ

Владимир Владимирович Шерстюк¹⁻⁴,
Гузель Ильдаровна Давлетшина^{1,3},
Сурен Минасович Закиян¹⁻⁴

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

vsherstyuk89@gmail.com

Лабораторная крыса является одним из основных объектов в области биологии и биомедицины. Данный объект широко используется для исследований в области физиологии, нейробиологии, фармакологии и изучения поведения, а также в области трансляционной медицины для изучения различных заболеваний человека и поиска подходов к их лечению. Для получения модельных животных применяют два подхода — это редактирование эмбрионов и внесение мутаций в плюрипотентные клетки с дальнейшей инъекцией в бластоцисту. Преимуществом использования плюрипотентных клеток является значительное сокращение количества необходимых для эксперимента животных. В настоящее время система CRISPR/Cas позволяет получать модели различных генетических заболеваний в достаточно короткие сроки. Однако для применения данной системы и редактирования генома в линиях плюрипотентных клеток крысы требуются эффективные подходы и протоколы. В данном исследовании была проведена работа по подбору оптимальных условий для внесения ДНК в плюрипотентные клетки крысы с помощью электропорации, а также по выбору наиболее эффективной системы CRISPR/Cas для редактирования генома плюрипотентных клеток крысы. В ходе работы были протестированы три системы со следующими нуклеазами: *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9), *Staphylococcus aureus* CRISPR/Cas9 (SaCas9) и *Acidaminococcus* sp. BV3L6 Cas12a (AsCpf1). Для тестирования был выбран локус *Rosa26*, который является так называемым *safe-harbor* локусом и широко используется для внесения трансгенов в геном крысы. Для каждой системы были выбраны три протоспейсера в данном локусе. Оценка эффективности систем производили путем анализа образования инсерций и (или) делеций. В результате была выбрана оптимальная и эффективная система для редактирования генома плюрипотентных клеток крысы и, в частности, для внесения трансгенов в локус *Rosa26* крысы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-00022.

ГИСТОТИПИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ СУХОЖИЛЬНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Анатолий Борисович Шехтер¹, Владимир Иванович Тельпухов², Дмитрий Сергеевич Суслин², Наталия Николаевна Воробьева⁴, Юрий Викторович Герасимов³, Алла Германовна Грошева³, Семен Николаевич Чурбанов^{1,4}, Алексей Леонидович Файзуллин¹, Александра Валерьевна Бутенко¹, Петр Сергеевич Тимашев^{1,4}, Рубен Карпович Чайлахян^{1,3}

¹ Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² Отделение травматологии и ортопедии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

⁴ ФНИЦ Институт фотонных технологий, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и Фотоника» РАН, Москва, Россия

a.shehter@yandex.ru

Проблема. Функциональное восстановление сухожилий после повреждений и разрывов остается весьма актуальной задачей. Использование методов тканевой инженерии считается одним из ведущих путей решения этой проблемы. Целью представленной работы было создание условий полного структурного восстановления сухожильной ткани и ее биомеханических функций в эксперименте на 24 кроликах.

Методы. Дефект среднего пучка ахиллова сухожилия замещался имплантатом, состоящим из синтетической сетки (Vicryl®) и коллагеновой губки, содержащей аутологичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ). В контрольной группе использовали бесклеточный скаффолд. Через 3 и 6 месяцев животных выводили из опыта и проводили гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследования, фазово-контрастную, темно-польную, поляризационную и сканирующую электронную микроскопию. Биомеханическое исследование (сопротивление на разрыв) проводили на 18 кроликах.

Результаты. Через 6 месяцев у большинства животных на месте дефекта среднего пучка в основном восстанавливалась сухожильная ткань, мало отличающаяся от интактных сухожилий: параллельные коллагеновые волокна и фибриллы, усиленный неоангиогенез. В контроле дефект был в основном заполнен неспецифической фиброзно-рубцовой тканью с небольшими участками регенерата. Биомеханические испытания показали, что максимальные растягивающие усилия на разрыв восстановленных сухожилий через 6 месяцев увеличились на 85% по сравнению с контролем и сравнялись с интактными сухожилиями или превосходили их.

Обсуждение. Полученные результаты позволяют заключить, что использование МСК КМ в данной тканевой инженерной конструкции, предотвращающей первоначальное растяжение дефекта, после резорбции скаффолда приводит к полной регенерации (реституции) сухожильной ткани.

МСК ХОРИОНА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Мария Александровна Шилина¹, Денис Николаевич Силачев², Наталья Алексеевна Пуговкина¹, Ирина Викторовна Кожухарова¹, Ольга Геннадьевна Люблинская¹, Николай Николаевич Никольский¹, Татьяна Михайловна Гринчук¹

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

shili-mariya@yandex.ru

Регенеративная медицина с использованием стволовых клеток (СК) человека получает все большее развитие с каждым годом. В своих исследованиях мы обратились к изучению клеток хориона человека. Нами было проанализировано 3 образца клеток, полученных из ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ. В системе *in vitro* все анализируемые клетки характеризовались профилем экспрессии поверхностных CD-маркеров и морфологией, типичной для клеток мезенхимального ряда. На 4–5 пассажах в логарифмической фазе роста регистрировалась заметная доля клеток в фазах синтеза ДНК и митоза, которая снижалась в последствии при уплотнении культуры. На 6–7 пассажах характер распределения по фазам клеточного цикла изменялся: наблюдалась низкая доля клеток в фазе синтеза ДНК, накопление клеток в фазе G₂/M и увеличение доли полиплоидных клеток, с количеством генетического материала > 2n. Оценка пролиферативной активности методами проточной цитометрии и построением кривых клеточного роста показали быстрое снижение пролиферативной способности всех культур по мере культивирования клеток, что является одним из основных недостатков данного объекта. Клетки хориона активно пролиферируют только 3–4 пассажа, а после 7 пассажа погибают. Такой короткий период активной жизни данных клеток не позволяет нарастить их в количестве, необходимом для использования в терапии. Кариологический анализ показал, что клетки хориона в культуре имеют околодиплоидный кариотип, склонный к поломкам хромосомного материала. Выявленная кариотипическая нестабильность клеток может быть объяснена стрессовым воздействием перевода клеток из системы *in vivo* в систему *in vitro*. Подводя итог настоящей работы можно сказать, что проанализированные нами клеточные линии хориона хотя по своим физиологическим характеристикам (морфологии, фенотипическому профилю) относятся к ряду мезенхимальных клеток, мало пригодны в качестве клеточного материала как в медицинских целях, так и в лабораторных исследованиях с длительными экспериментами. Все вышесказанное не умоляет работ по изучению физиологических и генетических характеристик МСК хориона т.к. эти данные могут быть полезны в области гинекологии и неонатологии, в связи с изучением причин неразвивающихся беременностей.

Работа выполнена в рамках и по тематике гранта РНФ № 19-14-00108.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ

Ирина Николаевна Шипунова, Наталия Арнольдовна Петинати, Нина Иосифовна Дризе, Екатерина Юрьевна Чельшева, Олег Александрович Шухов, Анна Григорьевна Туркина, Елена Николаевна Паровичникова, Валерий Григорьевич Савченко

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

iranifontova@yandex.ru

Введение. Клетки стромального микроокружения (СМ) костного мозга (КМ) необходимы для нормального кроветворения, и они же вовлечены во взаимодействие с лейкозными стволовыми клетками (ЛСК).

Цель работы: выявить изменения в СМ больных на модели мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) в дебюте заболевания и после лечения.

Методы. МСК больных острым миелоидным (ОМЛ, N=32), острым лимфобластным (ОЛЛ, N=20) и хроническим миелоидным (ХМЛ, N=19) лейкозами были получены стандартным методом из КМ пациентов при проведении диагностических аспираций после информированного согласия. Экспрессию генов изучали с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. В дебюте ОМЛ, ОЛЛ и ХМЛ в МСК больных достоверно повышена экспрессия генов, регулирующих СКК и кроветворные клетки-предшественницы (*JAG1*, *LIF*, *IL6*). Общим для миелоидных лейкозов оказались повышение экспрессии генов, регулирующих пролиферацию стромальных клеток (*PDGFRA* и *FGFR1*), и гена-маркера жировой дифференцировки (*PPARG*). При острых лейкозах в МСК повышена экспрессия генов, участвующих в процессах воспаления и регуляции кроветворных и стромальных предшественников (*CSF1*, *IL1B*, *IL1BR1*), и снижена — гена-маркера хондрогенной дифференцировки (*SOX9*).

В ходе лечения при всех нозологиях экспрессия генов *LIF* и *IL6* осталась повышенной, а снизилась — гена *ICAM1*, осуществляющего адгезию кроветворных клеток. В МСК больных ОМЛ, которые для достижения ремиссии получают наиболее высокие дозы цитостатических препаратов, выявлено достоверное снижение экспрессии большинства исследованных генов. У больных ОЛЛ, лечение которых отличается непрерывностью и продолжительностью курсов в сочетании с более низкими дозами препаратов, экспрессия *IL1B* повышается, а снижается экспрессия только некоторых генов, отвечающих за регуляцию СКК (*SDF1*, *TGFB1*), а также генов *SOX9*, *FGFR1* и *FGFR2*. Лечение больных ХМЛ базируется на ингибиторах тирозиновых киназ в дозировке, рассчитанной на многолетнее применение, и наименее повреждает МСК. Было выявлено повышение экспрессии генов *TGFB1*, *SOX9*, *PDGFRA*, и снижение — гена *IL1B*.

Заключение. Лейкозные клетки адаптируют СМ к поддержанию ЛСК. При разных лейкозах наблюдаются одинаковые изменения в экспрессии генов в МСК. Лечение зависит от нозологии и в разной степени изменяет МСК. Изменения экспрессии *IL6*, который может действовать как провоспалительный и противовоспалительный цитокин, и *LIF*, повышающийся в ответ на развитие опухоли в организме, остаются общими для всех трех исследованных заболеваний.

БИОЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕНОМНОЙ МЕДИЦИНЫ

Екатерина Михайловна Шкомова

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

eshkomova@yandex.ru

Медицинская генетика — молодая и перспективная область медицинской науки и практики, направленная на исследование генома человека с целью диагностики, профилактики и лечения наследственно обусловленных заболеваний. Активное развитие медицинской генетики стало причиной усиления процесса медиализации жизни, в рамках которого представление о теле человека, здоровье и болезни задается медицинским сообществом. Сегодня можно говорить и о генетизации жизни, процессе, который приводит к тому, что человек начинает конструировать свое будущее, исходя из знания своего генома. Однако необходимо учитывать, что несмотря на большие ожидания и капиталовложения в геномные технологии, в настоящее время генетическое тестирование не всегда может с достаточной точностью диагностировать заболевание. Отметим также, что есть заболевания диагностируемые, но неизлечимые, а есть болезни, которые диагностируются и поддаются коррекции. В зависимости от того, о какой категории заболевания идет речь, зависит выбор модели коммуникации между врачом и пациентом.

Со второй половины XX века начинается юридизация этических регулятивов медицины, происходит становление биоэтики, которая приводит к формированию новой модели взаимоотношений между врачом и пациентом, а также актуализирует проблему определения границ вмешательства в психофизическую целостность человека. Американские исследователи Т. Бичамп и Дж. Чилдресс сформулировали 4 принципа биоэтики — «не навреди», «делай благо», принципы уважения автономии пациента и справедливости, которые задают рамки, в которых должна функционировать медицина. Однако особенности медицинской генетики приводят к невозможности абсолютному следованию классическим биоэтическим принципам. Подчеркнем, что указанные выше принципы были разработаны для ситуаций, когда врач взаимодействует с одним конкретным пациентом, но при медико-генетическом консультировании субъектом выступают все родственники, которые могут быть носителями мутации. Таким образом, сложность вызвана семейным, коллективным статусом генетической информации. Несмотря на попытки создания механизмов гармонизации интересов пациента и членов его семьи (например, разработка новой формы информированного согласия в Великобритании), проблема остается нерешенной и требует глубокого междисциплинарного анализа.

Финансирование: работа выполнена в рамках деятельности ведущей научной школы МГУ им. М.В. Ломоносова «Трансформации культуры, общества и истории: философско-теоретическое осмысление».

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Анна Андреевна Шмакова^{1,2}, Ксения Андреевна Рубина², Анна Сергеевна Горбунова², Карина Дмитриевна Рысенкова^{1,2}, Полина Сергеевна Климович^{1,2}, Вероника Юрьевна Сысоева², Екатерина Владимировна Семина^{1,2}

¹ Лаборатория молекулярной эндокринологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия;

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

anya.shmakova@list.ru

Урокиназа uPA и ее рецептор uPAR являются одними из основных белков, осуществляющих ремоделирование матрикса, и активируют пролиферацию и миграцию клеток опухолевой ткани. Экспрессия uPA и uPAR в ткани опухоли повышена; степень повышения их экспрессии зачастую коррелирует с неблагоприятным прогнозом и эффективностью противоопухолевой терапии. Долгое время роль урокиназной системы в канцерогенезе, росте и метастазировании опухоли рассматривалась с точки зрения активации протеолиза. Так, показано, что активная урокиназа, запуская каскад реакций плазмина, стимулирует инвазию и миграцию клеток, высвобождает из матрикса задепонированные факторы роста, активирующие рост сосудов и пролиферацию клеток.

Дальнейшие исследования показали, что функциональная роль системы uPA/uPAR представляется гораздо более комплексной и не ограничивается протеолизом. При связывании урокиназы uPAR, не имеющей трансмембранного и цитоплазматического доменов, способен запустить обширный внутриклеточный сигнальный с участием различных киназ (FAK/Src, Ras/ERK, PI3K/Akt, JAK/STAT) за счёт латерального взаимодействия с другими рецепторами (интегрины, FPRL1, EGFR, PDGFR β), что приводит к увеличению выживаемости, пролиферации и миграторного потенциала опухолевых клеток.

Нами показано, что высокая экспрессия uPAR в клетках нейробластомы активирует JAK/STAT1 и Ras/ERK сигнальный, стимулирующий пролиферацию клеток нейробластомы. Напротив, при нокауте uPAR с помощью CRISPR/Cas9 наблюдалось уменьшение активации киназ PI3K/Akt и Ras/ERK и снижение пролиферации нейробластомы.

Исследуя механизмы, мы обнаружили, что несвязанная с рецептором uPA может проникать в ядро, связываться с фактором транскрипции NOXA5, который приводит к подавлению экспрессии ключевого онко-супрессора p53 и может способствовать выживанию опухолевых клеток. Наши результаты доказали, что снижение экспрессии uPAR и ассоциированное с этим увеличение uPA в ядре снижает экспрессию p53 и повышает устойчивость к цисплатину.

Таким образом, на настоящий момент становится очевидным, что урокиназная система вовлечена во многие этапы развития опухоли, поэтому она может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической мишени при лечении опухолей. Однако терапевтические подходы должны учитывать всю сложность функциональных взаимодействий урокиназной системы в онкогенезе и, вероятно, предпочтение должно отдаваться

подходам, нацеленным на двойное подавление урокиназы и ее рецептора.

Работа была выполнена за счет гранта РФФИ (проект № 17-04-00386).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА *CNTN6* В РАННИХ ЭТАПАХ НЕЙРОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

**Татьяна Александровна Шнайдер,
Олег Леонидович Серов**

*Институт Цитологии и Генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия*

shnayder.t@yandex.ru

Хромосомные болезни занимают одно из главных мест в структуре наследственной патологии человека. Они обусловлены как числовыми, так и структурными нарушениями хромосом и зачастую приводят к летальным эффектам. Те мутации, которые оказываются совместимыми с постнатальным развитием, ведут к хромосомным заболеваниям, проявляющимся в виде тяжелых нарушений физического и интеллектуального развития. За последние несколько лет были описаны сразу несколько пациентов с нарушениями умственного развития и различными мутациями в гене *CNTN6* (Kashevarova et al., 2014; Mercati et al., 2016; Schumann et al., 2016; Tassano et al., 2018; Repnikova et al., 2019). Однако до сих пор роль гена *CNTN6* в нейрогенезе человека не установлена. Недоступность прямого получения материала для исследования головного мозга человека потребовала создания новых экспериментальных подходов. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка технологии церебральных органоидов (ЦО) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), позволяющая реконструировать *in vitro* трехмерную организацию некоторых отделов эмбрионального головного мозга (Lancaster et al., 2013).

Данный подход мы решили применить для исследования роли гена *CNTN6* посредством сравнения нейрогенеза в ЦО, полученных из ИПСК здоровых доноров и пациентов-носителей делеции гена *CNTN6*. На модели трехмерных ЦО было установлено, что у здорового человека *CNTN6* экспрессируется не только в нейронах глубоких слоев кортекса, как это было ранее показано на мышиной модели (Ye et al., 2008), но и в Pax6-позитивных клетках вентрикулярной/субвентрикулярной зоны. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности *CNTN6* в регуляцию самых ранних этапов нейрогенеза человека. Более того, было установлено, что церебральные органоиды, полученные из линий гомозиготных ИПСК по мутации (*CNTN6*^{-/-}), имели значительные морфологические отличия от таковых, полученных из ИПСК от здоровых доноров. Общие размеры гомозиготных мутантных церебральных органоидов к 20-му дню уменьшены относительно ЦО от здоровых доноров и гетерозиготных носителей мутации. Кроме того, при анализе внутреннего строения ЦО на этой же стадии, было установлено, что количество петлеобразных структур, представляющих собой аналоги желудочков головного мозга с прилежащими вентрикулярной и субвентрикулярной областями, резко отличается в исследуемых генотипах. Таким образом, совокупность полученных данных указывает на новую функцию гена *CNTN6* в раннем нейрогенезе человека.

БИОМАТЕРИАЛЫ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Михаил Исаакович Штильман, Александр Анатольевич Артюхов, Анна Леонидовна Лусс, Андрей Николаевич Кусков

Кафедра биоматериалов, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

shtilmanm@yandex.ru

Область, связанная с созданием, исследованием и использованием биоматериалов, остается одним из наиболее динамично развивающихся направлений, объединяющих интересы различных наук и технологий — прежде всего химии и технологии низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, медицины, биотехнологии, и других наук и технологий, объединяемых понятием “life sciences and technologies”. Это подтверждается объемом рынка биоматериалов (более \$ 150 млрд к 2020 году с увеличением за 5 лет на 50%) и продукции с использованием биоматериалов (около \$ 600 млрд к 2020 году).

Важнейшим направлением применения биоматериалов является регенеративная медицина. Замещения в сердечно-сосудистой системе, костной системе, системах мягких тканей, системах органов чувств, в стоматологии и др., клеточные, тканевые и генные биоинженерные процессы, в которых используются различные биоматериалы, заняли важнейшее место в широком круге медицинских технологий.

За последние 10–15 лет спектр используемых в этой области материалов, как синтетических, так и натуральных, значительно расширился. Особое внимание в этих процессах занимают полимерные материалы, изделия из которых способны к биодegradации, сопровождаемой образованием новой живой ткани. В частности, среди таких материалов серьезное внимание привлекают такие полимеры как коллаген, хитозан, гиалуроновая кислота, различные полиэфиры гидроксикарбоновых кислот, в том числе микробного происхождения.

Разработаны новые подходы к созданию изделий из полимерных биоматериалов, такие как электроспиннинг и 3D формование, криоструктурирование, создание различных новых наноразмерных систем, которые раньше казались экзотическими, использование которых значительно расширили возможности данной области.

В то же время, проблемы создания экономически доступных полимерных материалов с заданными периодами биодegradации, материалов для создания изделий со стабильно высоким уровнем гемосовместимости, материалов для трансфекции, эффективных систем для склеивания мягких тканей и ряда других, остаются нерешенными, хотя работы в этих направлениях активно ведутся в различных странах.

Можно ожидать в ближайшем будущем разработки новых видов биоматериалов, в частности, композиционных, а также новых методов изготовления изделий из биоматериалов и областей их использования.

ВВЕДЕНИЕ ГЕНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ММСК ЖТ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНО ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОРОНАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Евгений Александрович Шуман¹⁻³,
Артем Владимирович Коротков^{1,2},
Олег Германович Макеев¹⁻³

¹ Отдел молекулярных и клеточных технологий, ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

² Лаборатория технологий клеточной и генной терапии, ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия;

³ Инновационный центр химико-фармацевтических технологий, Уральский Федеральный Университет, Екатеринбург, Россия

evgenyshuman@gmail.com

Геномобусловленным выключением долговременной адаптации к локальной ишемии миокарда у большей части человеческой популяции, так как только у каждого четвертого пациента с сосудистой недостаточностью развиваются коллатеральные сосуды. Перспективным направлением лечения коронарной недостаточности представляется разработка технологии генотерапии, однако введение отдельных генов, как было показано в целом ряде плацебо-контролируемых исследований, не сопровождалось значимым клиническим эффектом.

Целью исследования явилось поиск путей достижения полноценного неангиогенеза за счет активации комплекса факторов роста, участвующих в ангиогенезе.

Эксперимент проведен на кроликах — самцах породы Шиншилла. С целью обеспечения неполной окклюзии передней нисходящей ветви коронарной артерии сердца выполнялась перевязка ее проксимального сегмента на мандрене, сужающая просвет сосуда на 80%. Группе животных № 1 интрамиокардиально вводили физиологический раствор; группе животных № 2 — ММСК; группе животных № 3 — ММСК, трансфецированных геном VEGF-165. Трансфекцию ММСК проводили плазмидой с геном VEGF165 (pWZL Blast VEGF165).

Уровень ангиогенеза оценивали на 30 сутки после операции на срезах миокарда, окрашенных гематоксилин-эозином.

Однократное интрамиокардиальное введение ММСК приводит к увеличению общего количества капилляров, по сравнению с группой № 1, на 5,40%, диаметра открытых капилляров на 4,55%, длины функционирующих капилляров на 11,07%, увеличению площади обменной поверхности капилляров на 15,06% ($p \leq 0,05$) и увеличению парциального давления кислорода на 16,66%.

Однократное интрамиокардиальное введение ММСК, трансфецированных геном VEGF-165 в условиях моделируемой ишемии, приводит к увеличению общего количества капилляров, по сравнению с группой № 2, на 3,73%, диаметра открытых капилляров на 3,13%, длины функционирующих капилляров на 21,88% ($p \leq 0,05$), увеличению площади обменной поверхности капилляров на 23,96% ($p \leq 0,05$) и увеличению парциального давления кислорода на 30,55% ($p \leq 0,05$). По отношению с показателями группы № 1 все отличия группы № 3 достоверны.

В группе введения ММСК, трансфецированных геном VEGF-165, имеет место морфологически подтвержденная активация ангиогенеза.

АКТИВАЦИЯ МАР-КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ ПРИ РЕПАРАТИВНОМ ПРОЦЕССЕ

Ирина Александровна Шурыгина, Наталья Ильинична Аюшинова, Елена Евгеньевна Чепурных, Михаил Геннадьевич Шурыгина

ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия

shurygina@rambler.ru

Проблема управления ростом соединительной ткани является одной из ключевых в регенеративном процессе. В ИНЦХТ разрабатывается подход к управлению репаративным процессом при помощи воздействия на МАРкиназные механизмы регуляции.

В условиях асептической кожно-мышечной раны активация p38 MAPK отмечена с 3 по 14 сутки с максимумом на 3 сутки, JNK — с 1 по 3 сутки и на 14 сутки, ERK — с 1 до 14 суток с пиком активности на 3 сутки. В условиях посттравматической регенерации мышцы фосфорилированная форма p38 MAPK присутствует в единичных миосателлитах с 3 по 9 сутки после травмы, что соответствует их периоду активации и пролиферации. На 5 сутки обнаружена активация JNK в мышечных почках, что позволяет предположить участие JNK в активации и пролиферации миосателлитов. Активация ERK наблюдалась только на пятые сутки после травмы.

В условиях асептического повреждения брюшины активация p38 каскада отмечается с 6 часов до 30 суток с максимумом на 14 сутки. Экспрессия активной формы JNK MAPK имеет волнообразную динамику с двумя пиками — на 3 и 14 сутки. Экспрессия ERK MAPK имеет два пика активности — на 1 и 30 суток. 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.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ПОВТОРНЫХ ОПЕРАЦИЙ У КРОЛИКОВ

Елена Сергеевна Щукина, Ирина Сергеевна Кашапова, Дмитрий Владимирович Попов, Глеб Юрьевич Косовский

ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева», Родники, Россия

elena.rainis.lis@yandex.ru

Кролик является лабораторным объектом медико-биологических исследований. Диагностическая лапаротомия проводится для осуществления операционного доступа к органам брюшной полости для подтверждения первичного диагноза. На базе ФГБНУ НИИПЗК проведена диагностическая лапаротомия с целью изучения скорости заживления ран с использованием различного шовного материала у кроликов.

Объектом исследования являлись 4 кролика породы советская шиншилла в возрасте 1 года мужского пола

с массой тела 2–2,5. В качестве премедикации применяли атропина сульфат 0,1%, для полной анестезии — ксилазин 2% и для поддержания анестезирующих свойств в процессе лапаротомии — пропофол 1%. Разрез проводили по белой линии живота, в качестве шовного материала использовали кетгут 2/0, полигликолидную нить 2/0, полигликолидную нить с капролактоном 2/0 и Vicryl Rapide 2/0.

При использовании кетгута полное заживление раны отмечалось на 9 день после оперативного вмешательства, при этом на 2 и 3 день наблюдалась слабо выраженная аллергическая реакция, в дальнейшем подавленная организмом без применения лекарственных средств.

Заживление раны при применении полигликолидной нити с капролактоном установлено на 5 день операции.

Наилучшими свойствами, обеспечивающими высокую скорость восстановления поврежденных во время лапаротомии тканей у кроликов, обладает полигликолидная нить и Vicryl Rapide, способствующие рубцеванию мягких тканей уже на вторые сутки после нанесения ранения за счет стимуляции регенерационной гипертрофии. Полигликолидная нить и Vicryl Rapide содержат стеарат кальция, разлагаемый в процессе гидролиза, что снижает иммунологическую реакцию организма на данные материалы.

Таким образом, для закрытия зияния раны при однократной диагностической лапаротомии у кроликов рекомендуется использовать полигликолидную нить или Vicryl Rapide. В случае, если в течение 10 дней по условиям эксперимента лапаротомию необходимо проводить несколько раз, то в качестве шовного материала рекомендуется использовать кетгут с целью наименьшего травмирования кроликов.

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ, В ЛЕЧЕНИИ ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ НА ФОНЕ «ТОНКОГО» ЭНДОМЕТРИЯ

**Зульфья Нурудиновна Эфендиева¹,
Тимур Хайсамудинович Фатхудинов²,
Инна Анатольевна Аполихина^{1,2}**

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

² НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

efendievaz@yandex.ru

«Тонким» принято считать эндометрий менее 7 мм во вторую фазу менструального цикла. Согласно данным Shufaro Y. и соавт. толщина эндометрия 7 мм и менее, статистически значимо ассоциирована с более низкой частотой наступления беременности в циклах овариальной стимуляции. Среди основных причин недостаточного роста эндометрия выделяют частые внутриматочные вмешательства, хронический воспалительный процесс в слизистой матки, нарушение маточного кровотока и состояния, связанные с дефицитом эстрогенов. Стандартная терапия эстрогенами, препаратами, улучшающими кровообращение, не эффективна у части пациенток, и единственной возможностью для них реализовать свой репродуктивный потенциал становится суррогатное материнство.

Одним из перспективных и новых методов лечения маточного фактора бесплодия является введение в полость матки аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (Platelet Rich Plasma, PRP).

Процесс дегрануляции тромбоцитов связан с высвобождением факторов роста, которые запускают процессы регенерации и биологического синтеза в тканях.

По данным Chang Y. и соавт. частота имплантации и наступления клинической беременности статистически значимо были выше у пациенток, получавших внутриматочную инфузию аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, перед переносом эмбрионов. Нам представляется, что внутриматочное инъекционное введение PRP может существенно повысить эффективность этого способа лечения.

На базе НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова проводится исследование безопасности и эффективности инъекционного введения PRP в базальный слой эндометрия у женщин с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия. На данный момент в исследование включено 20 пациенток в возрасте до 38 лет ($32,5 \pm 3,6$ года) с толщиной эндометрия менее 7 мм ($4,93 \pm 0,99$ мм) во вторую фазу менструального цикла. В пролиферативную фазу цикла пациенткам было проведено инъекционное введение аутологичной PRP в толщу базального слоя эндометрия на глубину 2–3 мм с помощью эндоскопической иглы под контролем гистероскопии. При проведении контрольного ультразвукового исследования в следующем цикле толщина эндометрия статистически значимо увеличилась до $7,37 \pm 1,62$ мм. У 5 пациенток наступила беременность в первых циклах после проводимого лечения. Среди них у 3 беременность наступила после ЭКО, и у 2 зачатие наступило естественным путем.

Полученные нами предварительные результаты позволяют считать целесообразным применение данного метода для терапии женщин с бесплодием, обусловленным дисфункцией эндометрия.

ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ПОЧКИ

**Наталья Юдинцева¹, Максим Шевцов¹,
Наталья Михайлова¹, Татьяна Виноградова²,
Александр Муравьев², Игорь Самусенко³,
Людмила Яковлева⁴, Вячеслав Рыжов⁵**

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Санкт-Петербург, Россия

yudintceva@mail.ru

Туберкулез (ТБ) органов мочевыделительной системы является распространенной локализацией внелегочного ТБ. Несмотря на клиническое использование, функции мезенхимных стволовых клеток (МСК) в контексте ТБ плохо изучены. С одной стороны, показано, что МСК способны обеспечивать распространение и создание новой ниши для микобактерий. С другой, секретируя иммуномодулирующие факторы МСК способны принимать участие в регуляции иммунных реакций при ТБ. Несмотря на подтвержденную безопасность трансплантации МСК больным ТБ, достоверные данные о биораспределении клеток, введенных в организм, при физиологических и патологических

условиях, отсутствуют. Целью работы является оценка биораспределения МСК и эффективности клеточной терапии при внутривенном введении клеток в комплексном лечении ТБ почки. После инъецирования культуры *M. Tuberculosis* в паренхиму почки кролика и подтверждения формирования активного ТБ процесса провели стандартную противотуберкулезную терапию (ПТТ). Животных разделили на четыре группы: ПТТ с последующей клеточной терапией; ПТТ; контроль заражения (без лечения); контроль (интактные животные). Клетки поместили с помощью суперпарамагнитных наночастиц оксида железа. Гистологическую оценку эффективности клеточной терапии производили через 1 месяц после введения МСК. Показали, что животные, получившие ПТТ с последующей клеточной терапией и группы контроля заражения, имели поражение почек и легких в виде диссеминированных эпителиоидноклеточных гранулем различного размера с гигантскими многоядерными клетками и казеозным некрозом. При окраске по Цилю-Нильсену выявлены кислотоустойчивые микобактерии. Однако, применение МСК в комплексной терапии ТБ оказывало положительное влияние на репаративные процессы в виде снижения процесса диссеминации ТБ, уменьшения размера и количества гранулем. В группе кроликов, получавших ПТТ, гранулем в органах не обнаружено, что требует дальнейшего изучения влияния МСК на течение ТБ. Количественную оценку биораспределения МСК выполнили с помощью метода продольного нелинейного магнитного отклика. Содержание магнитных наночастиц определяли в 16-ти различных органах животных на сроках 1, 2, 3 и 7 сут. после проведения клеточной терапии. Наибольшее количество наночастиц обнаружили в селезенке, печени, легких и почках. В качестве контроля использовали животных, получивших клеточную терапию, но не зараженных ТБ. Показано, что при патологии биораспределение МСК отличается от контроля.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-08-00024.

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПРИСУТСТВИИ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ МИНЕРАЛЬНОЕ ВЕЩЕСТВО РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кристина Алексеевна Юрова¹, Валерия Владимировна Шуплецова¹, Ольга Геннадьевна Хазиахматова¹, Владимир Владимирович Малащенко¹, Егор Олегович Шунькин¹, Юрий Петрович Шаркеев², Екатерина Геннадьевна Комарова², Валентина Вадимовна Чебодаева², Павел Александрович Иванов¹, Игорь Альбертович Хлусов³, Лариса Сергеевна Литвинова¹

¹ Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;

² Институт физики прочности и материаловедения, СО РАН, Томск, Россия;

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

kristina_kofanova@mail.ru

потенциал в различных условиях культивирования *in vitro*. Целью исследования явилась оценка морфологических особенностей мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) при культивировании в присутствии 3D-матрикса, имитирующей регенерирующую костную ткань.

Нами была разработана модель трехмерного (3D) культивирования клеток с использованием подложек (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана с шероховатым (Ra=2–5 мкм) кальцийфосфатным (КФ) покрытием. Клеточная линия ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) была получена из липоаспирата человека. До начала культивирования число клеток, экспрессирующих молекулы CD105, CD73 и CD90 составляло не менее 95%; клеток, несущих маркеры CD45, CD34, CD20 и CD14 — не более 2%. Клетки инкубировали в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Gibco Life Technologies, США) без остеогенных добавок при 37°C, 100% влажности в атмосфере 5% CO₂. Иммунофенотипирование ММСК-ЖТ проводили на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Морфологическая оценка клеток выполнена при помощи конфокального микроскопа ZEISS LSM 700 с использованием специфичных красителей: DAPI (для окрашивания ядер), MitoTracker Green FM (для окрашивания митохондрий), Cell Plasma Membrane Staining Kit — Orange Fluorescence — Cytopainter (для окрашивания цитоплазмы). Съемку производили в течение 7 дней 1 раз в сутки с использованием объектива EC Plan-Neofluar 10x/O.3 DIC I. Определение фенотипического профиля культуры клеток после 14 дней культивирования позволило выявить увеличение числа клеток (p<0,05) с гемопоэтическим фенотипом CD45CD34CD14CD20⁺ при сокультивировании ММСК с 3D-матриksom. Число клеток, несущих молекулы CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ оставалось на уровне значений, полученных при оценке 2D-культур (контроль). В контрольных группах площадь клеточных оргanelл (ядер и митохондрий) оказалась больше по сравнению с экспериментальными 3D-культурами. Это может свидетельствовать о высокой функциональной активности клеток контрольной группы. Площадь цитоплазмы в клетках вокруг 3D-матрикса была меньше таковой в контроле, что может свидетельствовать об уменьшении расплывания ММСК. Морфологические изменения ядра и цитоплазмы ММСК в 3D-культурах косвенно свидетельствуют в пользу изменения фибробластоподобной формы клеток в более объемные активные остеобласты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-00071).

Исследование клеток позволяет оценить особенности клеточного поведения и функциональный

ВЛИЯНИЕ 3D-МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Кристина Алексеевна Юрова¹, Валерия Владимировна Шуплецова¹, Ольга Геннадьевна Хазиахматова¹, Владимир Владимирович Малащенко¹, Егор Олегович Шунькин¹, Юрий Петрович Шаркеев², Екатерина Геннадьевна Комарова², Валентина Вадимовна Чебодаева², Павел Александрович Иванов¹, Игорь Альбертович Хлусов³, Лариса Сергеевна Литвинова¹

¹ Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;

² Институт физики прочности и материаловедения, Томск, Россия;

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

kristina_kofanova@mail.ru

Повреждение костной ткани вызывает активацию каскадного механизма регенерации. При проведении остеосинтеза костных переломов с использованием кальций-фосфатных (КФ) материалов медицинского назначения, клиническая эффективность их применения определяется соотношением специфической остеогенной активности и потенциальной токсичности фосфатов кальция, высвобождающихся при биодеградации имплантата.

В связи с этим, *in vitro* исследование поведения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в присутствии искусственных материалов является важным этапом оценки цитотоксичности и (или) специфической активности имплантатов, предлагаемых к использованию в травматологии и ортопедии.

Эксперимент проведен с помощью разработанной модели трехмерного (3D) культивирования клеток *in vitro* с использованием подложек (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана с шероховатым (Ra=2–5 мкм) КФ покрытием. Клеточная линия ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) была получена из липоаспирата человека. Иммунофенотипирование ММСК-ЖТ проводили на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). До начала культивирования число клеток, несущих молекулы CD105, CD73 и CD90 составляло более 95%, клеток, экспрессирующих маркеры CD45, CD34, CD20 и CD14 — менее 4%. Клетки инкубировали в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Gibco Life Technologies, США) в течение 14–21 суток при 37°C, 100% влажности в атмосфере 5% CO₂.

После окончания времени инкубации (14 суток) исследование фенотипического профиля культуры CD73CD90CD105⁺ клеток после 14 дней культивирования не выявило статистически значимых различий при культивировании клеток в присутствии 3D-матрикса. В 2D-культуре на пластике доля живых клеток варьировала в пределах 87–98%. После 14-дневного сокультивирования ММСК-ЖТ с 3D-матриксами доля жизнеспособных клеток при окрашивании 0,4% трипановым синим, составила 82–95%. Негативное влияние шероховатости КФ покрытия на выживаемость клеток не установлено.

Через 21 сутки в 3D-культуре резко возрастала окраска межклеточного матрикса ализариновым красным, что свидетельствует в пользу дифференцировки ММСК в секретирующие остеобласты.

Таким образом, титановые подложки с рельефным КФ покрытием показали полезные остеоиндуктивные свойства при отсутствии цитотоксичности в отношении ММСК, что раскрывает их известную клиническую эффективность при остеосинтезе в случае переломов и заболеланий костной ткани.

Исследование выполнено при поддержке Гранта Президента (проект № МК-2452.2019.4).

СЕКРЕЦИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ, УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кристина Алексеевна Юрова¹, Валерия Владимировна Шуплецова¹, Ольга Геннадьевна Хазиахматова¹, Елена Сергеевна Малащенко¹, Юрий Петрович Шаркеев², Владимир Владимирович Малащенко¹, Егор Олегович Шунькин¹, Екатерина Геннадьевна Комарова², Валентина Вадимовна Чебодаева², Павел Александрович Иванов¹, Игорь Альбертович Хлусов³, Лариса Сергеевна Литвинова¹

¹ Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, Россия;

² Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия;

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

larisalitinova@yandex.ru

Повреждение костной ткани инициирует сигнальные каскады, запускающие механизм ее репаративной регенерации (Wang Y. et al., 2018). Мы предполагаем, что продукция провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α) при остеосинтезе переломов зависит от типа клеток (мононуклеарные лейкоциты крови (МНК); мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК)) и свойств имплантатов с кальцийфосфатной (КФ) поверхностью.

В эксперименте были использованы подложки (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости Ra = 2–5 мкм) КФ покрытие.

Выделение МНК проводилось методом центрифугирования на градиенте плотности фиколлуурографин (ρ=1,077 г/см³). Клетки (на 98–99% CD45CD3⁺) и инкубировали в полной питательной среде 48 часов при 37°C, 5% CO₂ во влажной атмосфере. CD73CD90CD105⁺ ММСК выделяли из жировой ткани человека (Litvinova L.S. et al., 2018) инкубировали 14 суток. Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали с помощью «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Концентрации цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF-α; пг/мл) определяли методом проточной флюориметрии (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США).

По истечении времени культивирования в присутствии 3D-матрикса было выявлено увеличение числа МНК с фенотипом CD3CD4CD71⁺ и резкое увеличение остеогенной дифференцировки ММСК. Число МНК, экспрессирующих маркеры активации (CD25, CD95) и дифференцировки (CD45RO, CD45RA), оставалось на уровне контрольных значений. В культуре МНК уровень провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6) был повышен в 50 раз (P<0,05) в сравнении с 2D-культурами.

Продукция TNF- α увеличилась в 1,5 раза в экспериментальных группах и достоверно отличалась от контрольных значений ($P < 0,05$).

ММСК либо не реагировали (IL-1b, IL-6), либо значительно (в 4 раза) снижали (TNF- α) секреторную активность в 3D-культуре.

Вывод. Клетками-мишенями, реагирующими на топографию КФ поверхности усилением провоспалительной активности в течении первых 14 суток, являются Т-лимфоциты, но не ММСК. Увеличение числа CD3CD4CD71⁺ клеток и концентраций провоспалительных цитокинов способствует инициации сигнального каскада, клиренсу очага повреждения от возможных патогенов и может быть триггером хоминга ММСК в очаг повреждения, что обеспечивает процесс репаративной регенерации костной ткани при остеосинтезе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВАЦИИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И ПРОВЕРКИ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Иван Антонович Яковлев¹⁻³, Ирина Георгиевна Старостина², Дарья Сергеевна Чулпанова², Алиса Алмазовна Шаймарданова², Валерия Владимировна Соловьева², Альберт Анатольевич Ризванов², Роман Вадимович Деев^{1,4}, Артур Александрович Исаев¹

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия;

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

³ ООО «Генотаргет», Москва, Россия;

⁴ Северо-Западный медицинский государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

ivan@ivan-ya.ru

Мышечные дистрофии характеризуются первичным поражением мышечной ткани, развивающимся непрерывно-прогредиентно, зачастую приводя к инвалидности в трудоспособном возрасте, а также к смерти в детском и подростковом возрасте. Общая распространенность мышечных дистрофий составляет 19.8–25.1:100000, высоко распространена группа пояснично-конечностных мышечных дистрофий (от 1:14500 до 1:123000). Этиотропного лечения этих заболеваний на сегодняшний день не существует. Учитывая то, что миодистрофии вызваны мутациями в генах, кодирующих мышечные белки, наиболее оптимальным подходом является генная терапия, позволяющая корректировать генетический материал клетки. В исследованиях по разработке генной терапии мышечных дистрофий возникает необходимость рассмотреть тот или иной подход (редактирование ДНК, РНК, оверэкспрессия, а также доставка терапевтических молекул различными векторами) не только теоретически, но и проанализировать *in vitro*. Учитывая распространенность миодистрофий, зачастую «труднодоступность» пациентов, многообразие мутаций и форм заболеваний, взятие биоптата для выделения и культивирования клеток в условиях лаборатории зачастую весьма затруднительно, или невозможно. Кроме этого, для создания молекул, действующих целенаправленно, на определенный участок ДНК или

РНК, требуются образцы клеток, имеющих соответствующую мутацию. Таким образом, необходимо создание клеточных тест-систем (моделей заболеваний) в условиях лаборатории из уже имеющегося или легкодоступного биоматериала. Оптимальным сегодня является применение системы геномного редактирования CRISPRCas9.

Нами выполнен дизайн молекулярного инструмента и получены лентивирусные частицы, содержащие трехкомпонентную систему транскрипционной активации CRISPRCas9-SAM, в основе которой инактивированная нуклеаза Cas9 и факторы VP64, P65 и HSF1. В фибробластах, полученных от пациента с пояснично-конечностной мышечной дистрофией 2Б (дисферлинопатией) с мутацией в 26 экзоне гена, кодирующего мышечный белок дисферлин (DYSF) был активирован ген *DYSF*. Селекцию трансдуцированных клеток последовательно проводили антибиотиками (гигромицин, зеоцин, бластицидин). Уровень мРНК измерялся с помощью ОТ-ПЦР и составил около 40% от контрольного. Экспрессия дисферлина в контрольных фибробластах была подтверждена с помощью иммуоблоттинга. Таким образом, нами получена *in vitro* тест-система для отработки точных молекулярных инструментов для редактирования ДНК и РНК, а также подходов, связанных с оверэкспрессией белка дисферлина.

3D-КОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ВИРУСНЫХ НАНОЧАСТИЦ ВТМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Игорь Владимирович Яминский^{1,2}, Ольга Валентиновна Синецына², Наталья Олеговна Калинина⁴, Михаил Эммануилович Тальянский^{3,5}

¹ Физический и химический факультеты, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия;

³ The James Hutton Institute, Dundee DD2 5DA, UK;

⁴ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Москва, Россия;

⁵ ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

yaminsky@nanoscopy.ru

Вирусные наночастицы перспективны для бионанотехнологии. Они монодисперсны, стабильны и могут быть получены в больших количествах. Поверхность вирусных частиц может быть модифицирована с целью придания ей дополнительных функций. Вирус табачной мозаики (ВТМ) — наиболее исследованный и используемый в бионанотехнологии вирус, имеющий палочкообразную форму диаметром 18 нм и длиной 300 нм. ВТМ был успешно применен в задачах тканевой инженерии. В работе из ВТМ сформировали 3D-каркас, который способствовал остеогенной дифференцировке стволовых клеток и последующей минерализации матрикса. В работе [3] показано *in vivo*, что композиты на основе гидрогеля и ВТМ могут быть использованы для замещения костной ткани и не вызывают системной токсичности.

Нами предложено использовать наноцеллюлозу и вирусоподобные частицы из модифицированного белка оболочки ВТМ для создания материалов, перспективных для замены костной ткани. Вирусоподобные частицы связывались с волокнами наноцеллюлозы и способствовали ее минерализации с образованием гидроксилпатита. Детальное исследование методом атомно-силовой

микроскопии выявило нетривиальный характер взаимодействия наноцеллюлозы и вирусоподобных частиц. До 60% площади поверхности волокон наноцеллюлозы оказалось покрыто квазикристаллами вирусоподобных наночастиц. Причем волокна наноцеллюлозы задавали направление ориентации вирусоподобных наночастиц. Образование квазикристаллов происходит за счет сил исключенного объема (взаимодействия Асакуры-Оосавы). Причем наноцеллюлоза действует как высокомолекулярная добавка, приводящая к возникновению осмотического давления, сближающего вирусоподобные частицы. Волокна наноцеллюлозы могут быть рассмотрены как палочкообразные частицы, увеличивающие общую объемную концентрацию частиц, что способствует возникновению жидкокристаллического упорядочения в системе.

В предложенном нами композите для тканевой инженерии наноцеллюлоза задает трехмерную структуру, а плотное покрытие из вирусоподобных частиц BTM определяет поверхностные свойства материала и его потенциал для взаимодействия с живыми системами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (17-52-560001).

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЙ ОБРАБОТКИ БИОПРОТЕЗОВ ДИ- И ПЕНТАЭПОКСИДАМИ

Евгения Викторовна Янкайте¹, Мария Александровна Суровцева^{1,2}, Ольга Владимировна Повещенко^{1,2}, Александр Петрович Лыков^{1,2}, Ирина Иннокентьевна Ким^{1,2}, Наталья Анатольевна Бондаренко^{1,2}, Ирина Юрьевна Журавлева², Александр Владимирович Богачев-Прокофьев²

¹ НИИКЭЛ — филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск

mursik@ngs.ru

Глютаровый альдегид является основным сшивающим агентом для биопротезов в кардиологии. Однако, он имеет ряд недостатков, таких как высокая токсичность и высокий риск кальцификации с последующей дисфункцией протеза. В качестве альтернативного

метода сшивки были предложены эпоксидные соединения. Обработка ими улучшает физико-механические и тромборезистентные характеристики. Цель исследования: оценка токсического действия биопротезов, предобработанных ди- и пентаэпоксидами, на мононуклеарные и эндотелиальные клетки. Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы бычьего (БП) и свиного (СП) перикарда с различными консервантами: глютаровый альдегид (ГА); диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДЭ); 5% ДЭ (экспозиция 10 дней), затем 2% 1,2,3,4,6-пента-О-{1-[2-(глицидилокси)этокси]этил}-D-глюкопиранозы (экспозиция 10 дней) (10+10). Для получения экстрактов образцы биоматериала культивировали в полной ростовой среде 72 ч при 37 °С в соотношении 0,2 г ткани/мл среды. Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров (МНК) выделяли на градиенте плотности фиколл/ верографина ($\rho=1.078$ г/л). МНК 25×10^4 /лун культивировали в стандартных условиях 24 ч, затем производили замену среды на 100 мкл экстракта. Токсичность оценивали в МТТ-тесте через 72 ч. На монослой ЕаНу 926 укладывали образцы перикарда размером 1×1 см. Через 48 ч инкубации конфлюэнтный слой оценивали на микроскопе Axio Observer (Zeiss, Германия). Результаты исследования статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 10,0 for Windows (StatSoft, США). Жизнеспособность МНК через 24 ч культивирования с экстрактами всех образцов перикарда оставалась высокой. Через 72 ч наиболее выраженный токсический эффект выявлен в группе БП-ГА (жизнеспособность 69%, $p<0,01$), а наименее- в группе БП-10+10 (жизнеспособность 81%). Для свиного перикарда разницы в жизнеспособности МНК для различных консервантов через 24 и 72 ч не было выявлено. Следует отметить, что жизнеспособность МНК в группе СП-ГА была статистически выше через 72 ч в сравнении с группой БП-ГА ($p=0,0001$). При культивировании перикарда на монослое ЕаНу 926 через 48 ч выявлена зона гибели клеток вокруг образца БП-ГА. Для остальных образцов перикарда не выявлены повреждения монослоя ЕаНу 926. Таким образом, предложенный способ обработки биологических протезов ди- и пентаэпоксидами не является токсичным для МНК и эндотелиальных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (Заявка № 16-15-10315).

СОДЕРЖАНИЕ

ВЫДАЮЩИЕСЯ УЧЕНЫЕ, ВНЕСШИЕ ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЙ ВКЛАД В РАЗВИТИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ	4	<i>Ильмира Ильдаровна Абдрахманова, Дарья Сергеевна Чулпанова, Владислав Моисеевич Чернов, Валерия Владимировна Соловьева, Елена Юрьевна Закирова, Альберт Анатольевич Ризванов</i>	
МАТЕРИАЛЫ IV НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ	11	Анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток собаки, экспрессирующих гены-супрессоры опухоли и гены-иммуномодуляторы in vitro	14
<i>Joseph Allen, Nikolai Nikolaevich Didenko</i> Mechanical Dissociation or Enzymatic Digestion for the Isolation of Neural Stem Cells for Therapeutic Use	11	<i>Заира Магомедовна Абдулатипова, Ирина Евгеньевна Трубицына</i> Действие аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на заживление операционной раны у крыс	15
<i>Natella Erukashvily, Julia Dombrovskaya, Anna Malashicheva, Daria Semenova, Anastasia Kotova, Varvara Bagaeva, Wolf-Dieter Grimm, Darius Widera, Irina Maslennikova, Dmitry Ivlgin</i> Adult Neural Crest-Derived Stem Cells (NCSCs) for comparative research	11	<i>Александр Андреевич Авдеев, Елена Викторовна Григорьева, Софья Викторовна Павлова, Сергей Петрович Медведев, Анастасия Александровна Малахова, Сурен Минасович Закиян</i> Разработка системы визуализации экспрессии гена GFAP – специфического маркера астроцитов	15
<i>Anastasiya Gorkun, Adam Jorgensen, Caterina Grasso, Naresh Mahajan, Mingsong Wu, Shay Soker, Anthony Atala</i> Skin Organoids As a Novel Tool for Analysis of the Skin Microenvironment In Vitro	12	<i>Виктория Сергеевна Айдарова, Владислав Георгиевич Бабийчук, Иван Иванович Ломакин, Ольга Валентиновна Кудокоцева</i> Влияние клеток пуповинной крови на особенности состояния вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс линии SHR ...	16
<i>Wolf-Dieter Grimm, Darius Widera</i> Secretome of stem cells as an alternative to stem cell transplantation	12	<i>Андрей Леонидович Акопов, Гарри Вазгенович Папаян, Станислав Дмитриевич Горбунков, Д.Д. Карал-Оглы, П.А. Капланян, Сергей Владимирович Орлов, Елена Александровна Губарева, Елена Вячеславовна Куевда, Дарья Михайловна Кузнецова</i> Флуоресцентная визуализации реваскуляризации трансплантированного сегмента трахеи приматов как перспективный метод оценки трансплантата	16
<i>Tatyana Isaeva, Maria Surovceva, Irina Kim, Mihail Smagin, Rustam Napaev, Vadim Nimaev</i> Treatment of diabetic peripheral artery disease with autologous bone marrow or peripheral blood derived cells	13	<i>Диана Яковлевна Алейник, Игорь Юрьевич Арефьев, Ирина Николаевна Чарыкова, Людмила Николаевна Докукина, Юлия Павловна Рубцова, Татьяна Ивановна Сидорова</i> Опыт использования мало-манипуляционных клеточных технологий при лечении ожогов	17
<i>Samal Kassymbekova, Tamara Bukeyeva, Indira Bishimova, Sholpan Tursunova, Sabina Murzageldinova, Tigran Davtyan</i> Stimulating effect of fs-1 on functional activity of lymphopoiesis and myelopoiesis progenitor cells in vitro	13	<i>Диана Яковлевна Алейник, Марфа Николаевна Егорихина, Ирина Николаевна Чарыкова, Юлия Павловна Рубцова, Лариса Николаевна Соснина, Андрей Александрович Стручков, Петр Владимирович Перетягин, Анна Геннадьевна Соловьева, Наталья Юрьевна Орлинская</i> БМКП для замещения дефектов кожи: характеристика и доклиническое исследование ...	17
<i>Nataliya A. Logvina, Ilya P. Kopnin, Ilya O. Aparin, Timofei S. Zatsepin</i> Improving CRISPR-Cas technology for therapeutic applications	13	<i>Мария Анатольевна Александрова</i> Дедифференцировка не нервных клеток — триггер регенерации нервной ткани млекопитающих	18
<i>Darius Widera</i> Translational 3D Cell Culture Systems for Clinically Compliant Expansion of Adult Stem Cells and Isolation of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles	14		

<i>Ольга Игоревна Александрова, Кирилл Эдуардович Журенков, Галина Алексеевна Писугина, Юлия Игоревна Хорольская, Татьяна Вячеславовна Машель, Дарья Александровна Переплетчикова, Илья Олегович Гаврилюк, Анатолий Сергеевич Дубовиков, Анна Владимировна Безушко, Игорь Николаевич Околов, Миральда Ивановна Блинова</i>	<i>Юрий Владиславович Андреев, Андрей Юрьевич Андреев, Сергей Петрович Домогатский, Егор Олегович Осидак</i>
Ключевые факторы эффективности клеточной трансплантации при репарации эпителия роговицы	Разработка искусственного аналога роговицы на основе коллагена
18	22
<i>Светлана Алексеевна Александрова, Юлия Александровна Нащекина, Михаил Георгиевич Хотин, Сергей Викторович Надеждин, Екатерина Владимировна Зубарева, Любовь Анатольевна Покровская, Миральда Ивановна Блинова, Наталья Аркадьевна Михайлова</i>	<i>Елена Ромуальдовна Андреева, Диана Константиновна Матвеева, Людмила Борисовна Буравкова</i>
Оценка специфической активности кондиционированной среды, полученной в процессе дифференцировки МСК человека в остеогенном направлении	Внеклеточный матрикс мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: особенности продукции и регуляции при «физиологической» гипоксии
19	22
<i>Наталья Андреевна Александрюшкина, Владимир Сергеевич Попов, Наталия Владимировна Данилова, Александр Вадимович Лобода, Павел Георгиевич Мальков, Павел Игоревич Макаревич</i>	<i>Наталья Вячеславовна Андреева, Кирилл Вячеславович Зотов, Владимир Исаакович Юсупов, Александр Вадимович Белявский</i>
Доклиническая оценка эффективности клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток для заживления пролежневого дефекта	Сероводород защищает от негативного воздействия инфракрасного лазерного излучения мезенхимальные стволовые и меланомные клетки
19	23
<i>Ольга Юрьевна Алексеева, Полина Ивановна Бобылева, Елена Ромуальдовна Андреева</i>	<i>Наталья Георгиевна Антоневиц, Андрей Евгеньевич Гончаров, Валерий Леонидович Чекан, Эльвира Анатольевна Стринкевич</i>
Влияние короткого гипоксического стресса на фенотип и секретом моноцит-производных макрофагов при взаимодействии с мезенхимальными стромальными клетками ...	Клеточная терапия хронических стенозов гортани и трахеи с применением аутологических мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки
20	23
<i>Лариса Леонидовна Алексеенко, Алиса Павловна Домнина, Ольга Геннадиевна Люблинская, Ирина Викторовна Кожухарова, Наталья Алексеевна Пуговкина, Ирина Исааковна Фридлянская, Николай Николаевич Никольский</i>	<i>Станислав Анатольевич Антонов, Екатерина Вячеславовна Новосадова, Игорь Анатольевич Гривенников</i>
Изменения молекулярно-генетического профиля мезенхимных стволовых клеток эндометрия в условиях 2D и 3D культивирования после сублетального теплового воздействия	Экстрасинаптические NMDA рецепторы регулируют процесс созревания дофаминергических нейронов человека
20	24
<i>Сабина Гульзаровна Али, Галина Анатольевна Божок</i>	<i>Лариса Валерьевна Антонова, Евгения Андреевна Сенокосова, Владимир Николаевич Сильников, Евгения Олеговна Кривкина, Андрей Владимирович Миронов, Леонид Семенович Барбараш</i>
Влияние концентрации дмсo в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят	Биофункционализация биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра RGD-пептидами: итоги экспериментального исследования
21	24
<i>Ольга Владимировна Анацкая, Андрей Леонидович Рунов, Максим Сергеевич Вонский, Марианна Викторовна Харченко, Сергей Владимирович Пономарцев, Артем Уристович Елмуратов, Александр Евгеньевич Виноградов</i>	<i>Лариса Валерьевна Антонова, Андрей Владимирович Миронов, Виктория Владимировна Севостьянова, Евгения Олеговна Кривкина, Татьяна Владимировна Глушкова, Елена Анатольевна Великанова, Леонид Семенович Барбараш</i>
Нарушение постнатального органогенеза сердца после неонатальной непереносимости лактозы	Биodeградируемые сосудистые заплатки для артериальной реконструкции, содержащие сосудистый эндотелиальный фактор роста
21	25
	<i>Ольга Юрьевна Антонова, Ольга Юрьевна Кочеткова, Андрей Юрьевич Михеев</i>
	Наноструктурированные скаффолды для направленного роста нейрональных клеток
	25

<i>Михаил Спартакович Арбатский, Георгий Дмитриевич Сагарадзе, Наталия Андреевна Басалова, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Выявление мезенхимных стромальных клеток в сперматогенной нише с помощью биоинформатических подходов	26	<i>Валерий Вартанович Багдасаров, Елена Анатольевна Багдасарова, Оганнес Артаваздович Симонян, Алексей Валерьевич Люндуп, Михаил Евгеньевич Крашенинников, Оксана Андреевна Головина</i> Клинический случай применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток у пациентки с септическим шоком	30
<i>Надежда Валерьевна Аргучинская, Евгений Евгеньевич Бекетов, Егор Олегович Осидак, Феликс Евгеньевич Северюков, Петр Викторович Шегай, Андрей Дмитриевич Каприн</i> Создание скаффолда щитовидного хряща человека методом 3D-биопринтинга	26	<i>Александра Ивановна Баглай, Мария Николаевна Балацкая, Александр Владимирович Балацкий, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i> Изменение активности тромбоцитов посредством лигандов Т-кадгерина: липопротеидов низкой плотности и адипонектина	30
<i>Дмитрий Валерьевич Архипов, Александр Анатольевич Глухов, Дмитрий Андреевич Атякшин, Александр Алексеевич Андреев</i> Эффективность кислородо-сорбционной обработки в регенерации мягких тканей	27	<i>Дмитрий Владимирович Багров, Елизавета Робертовна Павлова, Игорь Игоревич Никишин, Анастасия Ивановна Соколова, Александра Сергеевна Богданова, Дмитрий Владимирович Клинов</i> Электроформованные смеси из полилактида и белков крови — от исследования совместимости компонент к контролируемой структуре биоматериала	31
<i>Манарбек Бапович Аскаргов, Абай Кабатаевич Байгенжин, Темирлан Сибирьевич Карибеков, Максат Аскерович Жантурганов, Айгерим Хайруллаевна Жакупова, Назгуль Косбергеновна Кульмырзаева, Болат Габассович Купенов</i> Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга в комплексной терапии дилатационной кардиомиопатии	27	<i>Абай Кабатаевич Байгенжин, Манарбек Бапович Аскаргов, Наталия Алексеевна Криворучко, Айгерим Мырзахановна Иманбердиева, Эльмира Бериковна Кудайбергенова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова</i> Эффективность трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга при системной склеродермии	31
<i>Манарбек Бапович Аскаргов, Абай Кабатаевич Байгенжин, Темирлан Сибирьевич Карибеков, Андрей Алексеевич Логвиненко, Галия Масугутовна Шаймарданова, Алия Зейнуллаевна Оспанова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова</i> Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга устраняют аутоиммунные реакции и ускоряют регенерацию поврежденного участка толстой кишки при неспецифическом язвенном колите	28	<i>Абай Кабатаевич Байгенжин, Манарбек Бапович Аскаргов, Ольга Владимировна Ульянова, Айгерим Хайруллаевна Жакупова, Дана Талаповна Сайпиева, Дина Александровна Серебренникова, Галия Масугутовна Шаймарданова</i> Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при сахарном диабете II типа	32
<i>Манарбек Бапович Аскаргов, Дана Талаповна Сайпиева, Эльмира Бериковна Кудайбергенова, Айжан Абдисадиковна Ахаева, Айгерим Хайруллаевна Жакупова</i> Секреторная активность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с первичным билиарным циррозом печени	28	<i>Яна Маратовна Байзынова, Руслан Вячеславович Николаев, Екатерина Николаевна Балашова, Елена Юрьевна Осипова</i> Влияние мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга и пуповины на пролиферацию CD4 ⁺ лимфоцитов периферической крови	32
<i>Игорь Сергеевич Афонин</i> Разработка современного остеопластического материала для регенеративной хирургии костного скелета челюстей	29	<i>Владимир Павлович Баклаушев, Олег Владимирович Дуров, Владимир Анатольевич Кальсин, Сергей Владимирович Ким, Евгений Владимирович Гулаев, Александр Витальевич Троицкий, Jan-Eric Ahlfors</i> Механизм действия трансплантированных нейральных прогениторных клеток при спинальной травме: интеграция или паракринный эффект?	33
<i>Эльвира Руслановна Ахметзянова, Маргарита Николаевна Журавлева, Яна Олеговна Мухамедшина</i> Изучение изменений в поведении клеток микроглии в моделях травмы спинного мозга различной степени тяжести	29		
<i>Ассель Иосифовна Ахметова, Игорь Владимирович Яминский</i> Пьезокерамические биосенсоры для обнаружения вирусов, бактерий, белков	29		

<i>Т.В. Балабанова, А.Г. Сальникова, М.Г. Дроздова, Т.С. Демина, Н.А. Сажнев, Н.Р. Кильдеева, Е.А. Марквичева</i> Биодеградируемые макропористые матриксы на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами для регенеративной медицины	33	<i>Ирина Борисовна Белоглазова, Екатерина Сергеевна Зубкова, Константин Владимирович Дергилов, Елизавета Израилевна Ратнер, Евгений Константинович Шевченко, Елена Викторовна Парфенова</i> Взаимовлияние Notch-VEGFR-внеклеточный матрикс в процессе формирования капилляро-подобных структур в 2д модели со-культивирования эндотелиальных и мезенхимальных клеток	36
<i>Александр Владимирович Балацкий, Пётр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Владимир Сергеевич Попов, Мария Николаевна Балацкая, Наталья Игоревна Калинина, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i> Реакция прогениторных клеток интимы артерий на ангиотензин II и их возможная роль в развитии атеросклероза	34	<i>Майя Борисовна Белякова, Анастасия Васильевна Панова, Михаил Витальевич Черноуцкий, Наталья Валериевна Костюк, Михаил Владимирович Миняев, Джулианна Викторовна Лещенко</i> Оценка роли контактного окружения как фактора дедифференцировки адипоцитов	37
<i>Максим Витальевич Балясин, Денис Станиславович Барановский, Илья Дмитриевич Клабуков, Анна Гасымовна Демченко, Алексей Леонидович Файзуллин, Ольга Андреевна Красильникова, Михаил Евгеньевич Крашенинников, Алексей Валерьевич Ляндуп, Владимир Дмитриевич Паршин</i> Ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции на основе девитализованного матрикса для восстановления поврежденной трахеи: in vivo исследование	34	<i>Полина Юрьевна Бикмулина, Настасья Владимировна Кошелева, Анастасия Иосифовна Шпичка, Владимир Исаакович Юсупов, Владимир Георгиевич Гогвадзе, Петр Сергеевич Тимашев, Юрий Алексеевич Рочев</i> Фотобиомодуляция метаболизма клеток в 3D-системах	37
<i>Наталья Владимировна Баранова, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Анна Сергеевна Пономарева, Евгений Абрамович Немец, Виктор Иванович Савастьянов</i> Сравнительный анализ влияния биополимерного гидрогелевого и тканеспецифического матриксов на функциональную способность изолированных островков Лангерганса	35	<i>Полина Ивановна Бобылёва</i> Влияние направленной регуляции АФК на иммуномодуляторную активность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	38
<i>Наталья Андреевна Басалова, Георгий Дмитриевич Сагарадзе, Михаил Спартакович Арбатский, Ольга Александровна Григорьева, Иван Константинович Зайцев, Евгений Геннадьевич Евтушенко, Наталья Игоревна Калинина, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Секретируемые в составе внеклеточных везикул микроРНК как потенциальные медиаторы антифибротического действия мезенхимных стромальных клеток	35	<i>Михаил Сергеевич Божокин, Светлана Анатольевна Божкова, Даниил Валерьевич Качкин, Алесандр Анатольевич Рубель, Юлия Викторовна Сопова, Юлия Александровна Нащёкина, Миральда Ивановна Блинова, Михаил Георгиевич Хотин</i> Разработка клеточно-инженерной конструкции с изменённым генетипом культуры ММСК для замещения дефектов хрящевой ткани суставов	38
<i>Юлия Борисовна Басок, Алексей Михайлович Григорьев, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Евгений Абрамович Немец, Александра Дмитриевна Кириллова, Виктор Иванович Севастьянов</i> Создание тканеинженерной конструкции хрящевой ткани на основе микронизированного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса суставного хряща свиньи	36	<i>Дмитрий Александрович Боков, Дмитрий Александрович Горьков, Андрей Александрович Слободсков, Светлана Викторовна Нотова</i> Восстановление тканевых элементов плаценты после повреждения наночастицами меди: оценка роли фосфорилирующих тирозинкиназ — белковых продуктов гена SRC ...	39
		<i>М.А. Болдырева, Ю.Д. Молокотина, Е.К. Шевченко, И.Б. Белоглазова, Е.С. Зубкова, К.В. Дергилов, П.И. Макаревич, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова</i> Трансплантация гиперпродуцирующего фактора роста гепатоцитов (HGF) МСК жировой ткани в виде клеточных пластов эффективно стимулирует восстановление ишемизированной конечности мыши	39

<i>Виолетта Викторовна Болтовская, Виктория Викторовна Россинская, Ирина Феликсовна Нефедова, Лариса Николаевна Кулагина</i> Оптимизация протокола тестирования металлических образцов на культуре фибробластов	40	<i>Александра Юрьевна Бурматова</i> Особенности участия КМБ-2 в регуляции посттравматической регенерации костной ткани в условиях иммобилизационного остеопороза	44
<i>Дарья Андреевна Бородкина, Юлия Александровна Дылева, Ольга Викторовна Груздева, Екатерина Владимировна Белик</i> Влияние ишемической болезни сердца на продукции фактор роста фибробластов-21 локальных жировых депо	40	<i>Елена Борисовна Бурова, Ирина Олеговна Васильева, Вера Владиславовна Кошеверова, Михаил Алексеевич Витте, Римма Сергеевна Каменцева, Алла Николаевна Шатрова</i> Функции белка IGFBP3 в культуре стареющих стромальных стволовых клеток эндометрия человека: секреция, интернализация, паракринная индукция старения клеток микроокружения	44
<i>Виталий Андреевич Брунчуков, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виктория Андреевна Никитина, Ирина Владимировна Кобзева, Юлия Борисовна Сучкова, Дарья Юрьевна Усупжанова, Анна Андреевна Расторгуева, Ольга Александровна Максимова, Валерий Евгеньевич Крючихин, Сергей Владимирович Лищук, Елена Алексеевна Дубова, Константин Анатольевич Павлов, Валентин Андреевич Брумберг, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов</i> Применение мезенхимальных стволовых клеток плаценты при местных лучевых поражениях кожи	41	<i>Александра Валерьевна Бутенко, Анатолий Борисович Шехтер, Алексей Леонидович Файзуллин, Анатолий Федорович Ванин, Александр Валерьевич Пекшев, Татьяна Георгиевна Руденко</i> Различные способы доставки оксида азота для стимуляции раневого заживления	45
<i>Елена Владимировна Брызгалина</i> Роль междисциплинарного взаимодействия в функционировании биобанков: цели и формы .	41	<i>Татьяна Борисовна Бухарова, Андрей Вячеславович Васильев, Валерия Сергеевна Кузнецова, Егор Олегович Осидак, Елена Валерьевна Галицына, Георгий Евгеньевич Леонов, Наталья Леонидовна Фатхудинова, Сергей Петрович Домогатский, Игорь Иванович Бабиченко, Дмитрий Вадимович Гольдштейн, Анатолий Алексеевич Кулаков</i> Остеоиндуктивные свойства коллаген-фибронектинового гидрогеля с BMP-2 на модели орто- и гетеротопического неоостеогенеза у крыс	45
<i>Александр Станиславович Буинов, Бато Чингисович Холхоев, Ксения Николаевна Бардакова, Эльвира Разитовна Гафарова, Петр Сергеевич Тимашев, Виталий Федорович Бурдуковский</i> Электропроводящие биосовместимые нанокompозиты на основе хитозана и графена ...	42	<i>Татьяна Борисовна Бухарова, Анна Сергеевна Ефремова, Наталья Вадимовна Булатенко, Юлия Леонидовна Мельяновская, Ника Валентиновна Петрова, Наталия Юрьевна Каширская, Елена Кястутисовна Жекайте, Рена Абульфазовна Зинченко, Елена Ивановна Кондратьева, Дмитрий Вадимович Гольдштейн</i> Оценка функциональной активности белка cfrt на модели кишечных органоидов при новых и редких мутациях гена	46
<i>Людмила Борисовна Буравкова</i> Роль физических факторов микроокружения в функциональном состоянии прогениторных клеток	42	<i>Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова</i> Разработка метода получения и характеристика клеток кардиосфер	46
<i>Людмила Борисовна Буравкова, Ирина Вячеславовна Андрианов, Екатерина Андреевна Голикова, Александра Николаевна Горгостаева</i> Ex vivo экспансия гемопоэтических предшественников из пуповинной крови: роль клеточных и неклеточных факторов микроокружения	43	<i>Андрей Вячеславович Васильев, Валерия Сергеевна Кузнецова, Татьяна Борисовна Бухарова, Юрий Дмитриевич Загоскин, Елена Валерьевна Галицына, Тимофей Евгеньевич Григорьев, Сергей Николаевич Чвалун, Дмитрий Вадимович Гольдштейн, Анатолий Алексеевич Кулаков</i> Повышение биосовместимости матриц на основе термотропных хитозановых гидрогелей	47
<i>Ольга Юрьевна Буренина, Наталия Леонидовна Лазаревич, Тимофей Сергеевич Зацепин, Мария Петровна Рубцова, Ольга Анатольевна Донцова</i> Новая длинная некодирующая РНК HELIS — потенциальный биомаркер нормальных гепатоцитов человека	43		

<i>Андрей Вячеславович Васильев, Валерия Сергеевна Кузнецова, Татьяна Борисовна Бухарова, Юрий Дмитриевич Загоскин, Тимофей Евгеньевич Григорьев, Егор Олегович Осидак, Сергей Петрович Домогатский, Игорь Иванович Бабиченко, Андрей Геннадьевич Надточий, Сергей Николаевич Чвалун, Дмитрий Вадимович Гольдштейн, Анатолий Алексеевич Кулаков</i> Исследование остеоиндуктивного потенциала композиционных материалов на основе хитозана и коллагена на модели экстракционной лунки карликовых свиней	47	<i>Игорь Викторович Вахрушев, Анастасия Валерьевна Цветкова, Юлия Борисовна Басок, Алексей Михайлович Григорьев, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Елизавета Константиновна Нежурина, Анна Александровна Грядунова, Елизавета Валерьевна Кудан, Павел Анатольевич Каралкин, Станислав Владиславович Петров, Владислав Александрович Парфенов, Алиса Александровна Крохмаль, Frederico Pereira, Елена Анатольевна Буланова, Юсеф Джорджевич Хесуани, Владимир Александрович Миронов, Константин Никитич Ярыгин</i> Новые подходы к биопечати тканей человека с использованием мезенхимальных стромальных клеток различного происхождения	51
<i>Роман Геннадьевич Васильев, Анжела Евгеньевна Родниченко, Ольга Сергеевна Губарь, Алена Васильевна Злацкая, Инна Михайловна Гордиенко, Наталья Михайловна Тодосенко, Светлана Николаевна Новикова, Лариса Сергеевна Литвинова, Дмитрий Александрович Зубов</i> Сравнительный анализ морфофункциональных свойств постнатальных мультипотентных стволовых и(или) прогениторных клеток-производных нервного гребня из волосяного фолликула и дермы кожи	48	<i>Елена Валерьевна Введенская</i> Этико-правовые проблемы генно-инженерных манипуляций с эмбрионами и половыми клетками человека	51
<i>Вячеслав Сергеевич Васильев, Сергей Александрович Васильев, Жанна Ивановна Терюшкова, Юрий Сергеевич Васильев, Игорь Сергеевич Васильев, Илья Игоревич Еремин</i> Безопасность клинического применения липофилинга и локальных инъекций стромально-васкулярной фракции жировой ткани у онкологических пациентов	49	<i>Елена Анатольевна Великанова, Вера Геннадьевна Матвеева, Евгения Олеговна Кривкина, Виктория Владимировна Севостьянова, Татьяна Владимировна Глушкова, Марьям Юрисовна Ханова, Лариса Валерьевна Антонова</i> Опыт применения эндотелиальных клеток различного происхождения для эндотелизации тканеинженерного сосудистого протеза в условиях in vitro	52
<i>Вячеслав Сергеевич Васильев, Сергей Александрович Васильев, Жанна Ивановна Терюшкова, Юрий Сергеевич Васильев, Игорь Сергеевич Васильев, Илья Игоревич Еремин</i> Возможности применения продуктов на основе аутологичного липоасpirата в коррекции рубцов	49	<i>Константин Александрович Ветошкин, Наталья Васильевна Исаева, Мария Александровна Бутолина, Наталья Викторовна Минаева, Наталья Александровна Зорина, Марина Николаевна Хоробрых</i> Результаты изучения количества альдегиддегидрогеназа-положительных мезенхимальных клеток костного мозга доноров	52
<i>Вячеслав Сергеевич Васильев, Сергей Александрович Васильев, Жанна Ивановна Терюшкова, Юрий Сергеевич Васильев, Игорь Сергеевич Васильев, Илья Игоревич Еремин, Евгений Алексеевич Ломакин, Георгий Павлович Димов</i> Механизмы биологического действия различных продуктов на основе аутологичного липоасpirата и возможности их клинического применения	50	<i>Олег Васильевич Ветровой, Виктор Андреевич Стратиллов, Екатерина Иосифовна Тюлькова</i> Нарушения функционирования глутаматной системы гиппокампа потомства крыс, вызванные стрессорным ответом матери на гипоксию, вовлекаются в формирования возраст-ассоциированного когнитивного дефицита	53
<i>Вячеслав Сергеевич Васильев, Жанна Ивановна Терюшкова, Андрей Владимирович Важенин, Сергей Александрович Васильев, Евгений Алексеевич Ломакин, Георгий Павлович Димов, Илья Игоревич Еремин</i> Безопасность и эффективность инъекционной аутотрансплантации жировой ткани и стромально-васкулярной фракции в лечении постлучевых ректовагинальных свищей и язв прямой кишки	50	<i>Екатерина Владимировна Викторова, Ирина Петровна Савченкова, Светлана Александровна Васильева, Дарья Григорьевна Корovina</i> Лечение остеоартроза собак микрофрагментированной жировой тканью	53
		<i>Максим Александрович Вовченко, Эрдэм Баирович Дашинамаев, Кирилл Константинович Сухинич</i> Управление ростом аксонов нейронов человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток при помощи электростимуляции	54

<i>Елизавета Сергеевна Войнова, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин</i> Изменение пролиферативно- дифференцировочного потенциала мезенхимных стромальных клеток как показатель старения на клеточном уровне	54	<i>Дилара Зильбаровна Гатина, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Маргарита Николаевна Журавлева, Ильназ Марселевич Газизов, Ильнур Ильдусович Салафутдинов</i> Проангиогенная активность моноклеарных клеток крови пуповины человека генетически модифицированных рекомбинантными аденовирусами	58
<i>Станислав Евгеньевич Волчков, Ольга Владимировна Тюмина, Павел Анатольевич Овчинников, Лариса Михайловна Трусова, Татьяна Александровна Романова, Ольга Олеговна Галахова</i> Опыт применения гемопоэтических клеток пуповинной крови у детей с расстройством аутистического спектра	55	<i>Дилара Зильбаровна Гатина, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов, Альберт Анатольевич Ризванов</i> Активация ангиогенеза эндотелиальных клеток с помощью мультигенных систем	59
<i>Ива Глебовна Воробьева, Татьяна Борисовна Карягина</i> Проверка фенотипической стабильности генетически измененных клеток отобранных методом химерного сортирования	55	<i>Дилара Зильбаровна Гатина, Маргарита Николаевна Журавлева, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов, Альберт Анатольевич Ризванов</i> Влияние ко-экспрессии VEGF и FGF-2 на процессы ангиогенеза in vivo	59
<i>Ива Глебовна Воробьева, Петр Серафимович Еремин, Ильмира Ренатовна Гильмутдинова</i> Кондиционированная среда с секретрируемым hBMP-2 как основа для трансформации человеческих MSC, полученных из жировой ткани, для усиления их остеогенного потенциала . . .	56	<i>Эльвира Разитовна Гафарова, Алексей Эдуардович Лажко, Илья Александрович Бажанов, Байрон Симбараше Капомба, Анастасия Сергеевна Курьянова, Екатерина Андреевна Гребеник, Петр Сергеевич Тимашев</i> Децеллюляризация аортального клапана в среде сверхкритического диоксида углерода	60
<i>Анастасия Денисовна Воронова, Ольга Владиславовна Степанова, Марат Петрович Валихов, Андрей Викторович Чадин, Екатерина Константиновна Карсунцева, Алевтина Сергеевна Семкина, Игорь Владимирович Решетов, Владимир Павлович Чехонин</i> Получение и применение комбинированного препарата клеток обонятельной выстилки при травмах спинного мозга	56	<i>Максим Юрьевич Герасимов, Дмитрий Сергеевич Островский, Борис Эдуардович Малюгин, Сергей Анатольевич Борзенко</i> Безфидерная культура клеток эпителия слизистой губы человека для клеточной трансплантации при заболеваниях роговицы	60
<i>Мария Владимировна Воронцова, Константин Юрьевич Кулебякин, Лейла Салиховна Созаева, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Никита Сергеевич Волошин, Антон Александрович Картошкин, Александра Александровна Королева, Дмитрий Кузьмич Мартынов</i> Особенности сигналинга паратиреоидного гормона и его влияние на способность остеогенной дифференцировки мезенхимных стромальных клеток	57	<i>Ирина Валериевна Гилевич, Владимир Борисович Карпюк, Марина Дмитриевна Перова, Владимир Алексеевич Порханов</i> Преимущества клеточной технологии в хирургическом лечении хронического развившегося пародонтита	61
<i>Юлия Сергеевна Высочанская, Сергей Валентинович Моргунов</i> Апоптоз буккального эпителия в аутоагрессии одонтобластов и его модерация	57	<i>Ирина Валериевна Гилевич, Александр Сергеевич Сотниченко, Андрей Владимирович Поляков, Сергей Борисович Богданов, Карина Игоревна Мелконян, Лариса Афанасьевна Медведева, Владимир Алексеевич Порханов</i> Морфологический анализ результатов комплексного подхода к лечению ожоговой раны с применением дермальных фибробластов	61
<i>Елена Валерьевна Галицына, Татьяна Борисовна Бухарова, Анастасия Витальевна Бобылева, Александр Сергеевич Дьяконов, Ирина Александровна Кривошеева, Михаил Юрьевич Скоблов, Дмитрий Вадимович Гольдштейн</i> Регуляция остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток путем нокадауна гена гликогенсинтазы киназы-3 β	58	<i>Ильмира Ринатовна Гильмутдинова, Регина Димьяновна Мустафина, Петр Серафимович Еремин</i> Исследование биологических свойств раневого покрытия на основе компонентов внеклеточного матрикса	62

<i>Екатерина Андреевна Голикова, Ирина Вячеславовна Андрианова, Людмила Борисовна Буравкова</i> Особенности взаимодействия гемопоэтических предшественников и мезенхимальных стромальных клеток при моделировании эффектов микрогравитации	62	<i>Анна Сергеевна Горбунова, Татьяна Викторовна Денисенко, Борис Давидович Животовский</i> BNIP3 как регулятор митофагии и эпителиально-мезенхимального перехода	66
<i>Елена Станиславовна Головнева, Жан Александрович Ревель-Муроз, Максим Валерьевич Сокол, Полина Андреевна Фортыгина, Александр Александрович Чесноков, Татьяна Геннадьевна Кравченко</i> Влияние лазерного облучения красного костного мозга на течение аллоксанового диабета	63	<i>Анна Андреевна Горелова, Александр Николаевич Муравьев, Наталия Михайловна Юдинцева, Юлия Александровна Нащёкина, Татьяна Ивановна Виноградова, Андрей Игоревич Горелов, Пётр Казимирович Яблонский</i> Экспериментальная пластика уретры тканеинженерными конструкциями	67
<i>Полина Александровна Голубинская, Марина Владиславовна Сарычева, Сергей Викторович Надеждин, Юрий Евгеньевич Бурда</i> Влияние вальпроевой кислоты, эритропоэтина и дексаметазона на функциональную активность мезенхимальных стволовых клеток	63	<i>Анастасия Алексеевна Горкун, Дарья Петровна Ревокатова, Ирина Михайловна Зурина, Настасья Владимировна Кошелева, Лариса Николаевна Скуратовская, Ирина Николаевна Сабурина</i> Двойная эндотелиальная и остеогенная дифференцировка сфероидов из стромальных клеток жировой ткани	67
<i>Полина Александровна Голубинская, Марина Владиславовна Сарычева, Сергей Викторович Надеждин, Юрий Евгеньевич Бурда</i> Сравнение противовоспалительного действия секрета мезенхимальных стромальных клеток коров <i>in vitro</i>	64	<i>Александра Николаевна Горностаева, Елена Ромуальдовна Андреева, Людмила Борисовна Буравкова</i> Особенности профиля иммуносупрессивных рецепторов/лигандов мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при <i>in vitro</i> гипоксии	68
<i>Полина Александровна Голубинская, Андрей Николаевич Рябчинский, Сергей Викторович Надеждин, Максим Викторович Пузанов, Юрий Евгеньевич Бурда</i> Клеточные технологии за рамками стволовых клеток	64	<i>Владимир Николаевич Горшенёв, Олег Валерьевич Градов, Маргарита Алексеевна Градова</i> Дифференциальная ориентационная оценка структурных биомиметических свойств пористых тканеинженерных конструкций с использованием систем корреляционно-спектрального анализа реального времени и математического аппарата теории морфизмов и (или) теории категорий	68
<i>Марина Олеговна Гомзикова, Севиндж Камаловна Клетухина, Ольга Андреевна Неустроева, Сирина Василевна Курбангалеева, Альберт Анатольевич Ризванов</i> Иммуномодулирующие свойства индуцированных микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток	65	<i>Владимир Николаевич Горшенёв, Анатолий Александрович Ольхов, Олег Валерьевич Градов, Маргарита Алексеевна Градова, Павел Леонидович Александров</i> Эмерджентный топологический подход к интеграции свойств твердотельных и частично-упорядоченных сред в пористых скаффолдах и тканеинженерных конструкциях: анализ на примере гидроксипатита и полигидроксibuтирата с многоосной CLSEM-визуализацией	69
<i>Залина Залимгериевна Гоникова, Алла Олеговна Никольская, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Мурат Юнусович Шагидулин, Нина Андреевна Онищенко, Виктор Иванович Севастьянов</i> Различия в регуляции восстановительных процессов в повреждённой печени при использовании клеток костного мозга и общей РНК этих клеток	65	<i>Олег Валерьевич Градов</i> Многоугольная лазерная и электронно-пучковая порозиметрия скаффолодов, децеллюляризованных матриц и тканеподобных моделей, в том числе — в ESEM- и CLEM-имплементации	69
<i>Андрей Евгеньевич Гончаров, Александр Викторович Прохоров, Оксана Васильевна Тимохина</i> Применение дендритных клеток в комплексном лечении рака поджелудочной железы	66	<i>Елена Георгиевна Гребенщикова</i> Этические измерения медицинского прогноза: новые вызовы и проблемы	70

- Игорь Анатольевич Гривенников, Екатерина Вячеславовна Новосадова, Алла Викторовна Ставровская, Елена Львовна Арсеньева, Станислав Анатольевич Антонов, Вера Вячеславовна Симонова, Леонид Георгиевич Хаспеков, Ольга Сергеевна Лебедева, Мария Андреевна Лагарькова, Николай Федорович Мясоедов, Вячеслав Залманович Тарантул, Сергей Николаевич Иллариошкин*
Технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для исследования и разработки подходов к клеточной терапии болезни Паркинсона 70
- Мария Гридина, Сергей Ульянов, Полина Белокопытова, Вениамин Фишман, Игорь Лебедев, Сергей Разин, Олег Серов*
Гетерохроматизация прителомерного района третьей хромосомы, содержащего масштабную дупликацию, у пациента с недифференцированной умственной отсталостью 71
- Тимофей Евгеньевич Григорьев, Кристина Георгиевна Антипова, Юрий Дмитриевич Загоскин, Ксения Игоревна Луканина, Елена Александровна Храмова, Сергей Владимирович Крашенинников, Сергей Николаевич Чвалун*
Пористые полимерные материалы для тканевой инженерии 71
- Тимофей Евгеньевич Григорьев, Юрий Дмитриевич Загоскин, Ксения Игоревна Луканина, Тимур Казбекович Токаев, Сергей Владимирович Крашенинников, Казбек Васильевич Токаев, Виктор Иванович Севастьянов, Сергей Николаевич Чвалун*
Физико-механические свойства и биосовместимость пористых материалов на основе полилактида для замещения больших объемов мягких тканей 72
- Елена Викторовна Григорьева, Туяна Баировна Маланханова, Софья Викторовна Павлова, Елизавета Ивановна Устьянцева, Сергей Петрович Медведев, Сурен Минасович Закиян, Анастасия Александровна Малахова*
Современные подходы в изучении нейродегенеративных заболеваний in vitro 72
- Ольга Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Александровна, Наталья Андреевна Басалова, Максим Александрович Виговский, Мария Александровна Кулебякина, Анастасия Юрьевна Ефименко*
Оксидативный стресс стимулирует трансдифференцировку эндотелиоцитов в мезенхимные клетки (эндотелиально-мезенхимный переход) 73
- Ольга Сергеевна Гринаковская*
Мультипотентный потенциал ММСК костного мозга человека при культивировании 73
- Анна Александровна Грядунова, Сергей Александрович Родионов, Елизавета Валерьевна Кудан, Юсеф Джоржевич Хесуани, Владимир Александрович Миронов, Елена Анатольевна Буланова*
Пертурбанты цитоскелета влияют на слияние и распластывание хондросфер 74
- Елена Вячеславовна Дементьева, Михаил Михайлович Слотвицкий, Юрий Викторович Вяткин, Евгений Иванович Кретов, Виктория Романовна Коваленко, Сергей Петрович Медведев, Дмитрий Николаевич Штокало, Сурен Минасович Закиян*
Исследование динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах, полученных при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с гипертрофической кардиомиопатией 74
- Константин Владимирович Дергилев, Зоя Ивановна Цоколаева, Ирина Борисовна Белоглазова, Екатерина Сергеевна Зубкова, Елизавета Израилевна Ратнер, Елена Викторовна Парфенова*
Урокиназный рецептор участвует в адгезии прогениторных клеток сердца к витронектину ... 75
- Константин Владимирович Дергилев, Зоя Ивановна Цоколаева, Ирина Борисовна Белоглазова, Екатерина Сергеевна Зубкова, Елизавета Израилевна Ратнер, Елена Викторовна Парфенова*
Урокиназный рецептор модулирует поведение прогениторных клеток сердца и определяет их репаративные свойства после инфаркта 75
- Константин Владимирович Дергилев, Зоя Ивановна Цоколаева, Юлия Дмитриевна Василец, Елизавета Израилевна Ратнер, Елена Викторовна Парфенова*
Урокиназный рецептор регулирует формирование кардиосфер 76
- Павел Дерябин, Анастасия Грюкова, Алла Шатрова, Николай Никольский, Александра Бородкина*
Фундаментальные механизмы взаимосвязи клеточного старения и децидуализации эндометриальных стромальных клеток в контексте женской репродуктивности 76
- Юрий Борисович Дешевой, Тамара Алексеевна Насонова, Ольга Александровна Добрынина, Роман Вадимович Деев, Владимир Георгиевич Лебедев, Алла Васильевна Лырщикова, Татьяна Алексеевна Астрелина, Борис Борисович Мороз*
Условия применения сингенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) жировой ткани для терапии тяжелых радиационных поражений кожи в эксперименте 77

<i>Ольга Владимировна Дилекова, Василиса Васильевна Митенко</i> Возрастная динамика c-kit/SCF-R в поджелудочной железе млекопитающих	77	<i>Наталья Николаевна Дремина, Ирина Сергеевна Трухан, Михаил Геннадьевич Шурыгин, Ирина Александровна Шурыгина</i> bFGF повышает уровень окислительного фосфорилирования в фибробластах	81
<i>Павел Михайлович Докшин, Андрей Александрович Карпов, Анна Борисовна Малашичева</i> Активация сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования в мезенхимных клетках сердца при остром гипоксическом стрессе	78	<i>Нина Иосифовна Дризе</i> Принцип поликлональности в кроветворной системе	81
<i>Александр Александрович Долгалев, Дмитрий Викторович Бобрышев, Николай Николаевич Диденко, Виктор Иванович Зеленский</i> Влияние способа обработки поверхности имплантационных материалов на уровень АТФ МСК пульпы зуба человека	78	<i>Татьяна Клеониковна Дубовая, Мария Владиславовна Гусева, Андрей Александрович Каменский</i> Особенности восстановительных процессов в мозге крыс на фоне применения пищевого холина	82
<i>Александр Александрович Долгалев, Виктор Иванович Зеленский, Игорь Владимирович Ржепаковский, Николай Николаевич Диденко</i> Титановые имплантаты с наноструктурированной поверхностью как материал-носитель для трансплантации стволовых клеток производных нервного гребня (NCSC) на модели стандартизированного костного дефекта	79	<i>Андрей Андреевич Дудун, Елизавета Александровна Акулина, Татьяна Константиновна Махина, Антон Павлович Бонарцев, Вера Владимировна Воинова, Гарина Александровна Бонарцева</i> Изменение бактериального сообщества в кишечной микробиоте с имплантируемой биополимерной конструкцией на основе поли-3-оксибутирата и альгината	82
<i>Дмитрий Александрович Долгушкин, Владимир Анатольевич Лазарев, Наталья Николаевна Сарбаева, Павел Михайлович Зельтер</i> Новый способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики обогащенной тромбоцитами аутоплазмой (экспериментальное исследование)	79	<i>Юлия Александровна Дылева, Дарья Андреевна Бородкина, Ольга Викторовна Груздева, Екатерина Владимировна Белик</i> Особенности чувствительности к лептину локальных жировых депо у пациентов с ИБС и пороками сердца	83
<i>Дмитрий Александрович Долгушкин, Владимир Анатольевич Лазарев, Наталья Николаевна Сарбаева, Лариса Теодоровна Волова</i> Опыт применения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы при хондропластике в эксперименте у кроликов	80	<i>Мария Николаевна Евсеева, Данияр Таалайбекович Дыйканов, Максим Николаевич Карагяур, Юрий Петрович Рубцов, Константин Юрьевич Кулебякин</i> Гомеобоксный гематопозитический фактор транскрипции Nhex — новый регулятор адипоцитарной дифференцировки.	83
<i>Алиса Павловна Домнина, Лариса Леонидовна Алексеенко, Ирина Исааковна Фридлянская, Ольга Геннадьевна Люблинская, Ирина Викторовна Кожухарова, Николай Николаевич Никольский</i> Мезенхимные стволовые клетки, культивируемые на бессывороточных средах, сохраняют стволовые свойства и проявляют повышенную терапевтическую активность при организации в сфероиды	80	<i>Марфа Николаевна Егорихина, Диана Яковлевна Алейник, Ирина Николаевна Чарыкова, Юлия Павловна Рубцова</i> Использование широкопольной флуоресцентной микроскопии для оценки взаимодействия клеток с матрицами-носителями на этапе доклинических исследований in vitro	84
<i>Алена Игоревна Дорофеева, Ирина Николаевна Шипунова, Наталия Арнольдовна Петинати, Алексей Евгеньевич Бигильдеев, Нина Иосифовна Дризе</i> Активация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с помощью фактора некроза опухоли- α происходит при участии интерлейкина-1 β	81	<i>Алексей Александрович Егоров, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев</i> Модификация брушитовых цементах молочной и янтарной кислотой	84
		<i>Александра Юрьевна Егоршина, Алексей Владимирович Замараев, Борис Давидович Животовский, Гелина Сергеевна Копейна</i> Взаимодействие некроптоза, аутофагии и апоптоза при митотической катастрофе	85

<i>Мария Игоревна Ездакова, Екатерина Андреевна Голикова, Ирина Вячеславовна Адриановна, Елена Ромуальдовна Андреева, Людмила Борисовна Буравкова</i> Динамика индуцированного остеоконмитирования пролиферативно-неактивных МСК в условиях тканевой концентрации кислорода	85	<i>Софья Алексеевна Ерохина, Мария Алексеевна Стрельцова, Юлия Дмитриевна Тетерина, Леонид Михайлович Каневский, Елена Ивановна Коваленко, Сергей Михайлович Деев, Александр Михайлович Сапожников</i> Внеклеточная форма белка теплового шока БТШ70: возможности использования экзогенного БТШ70 для комбинированной НК-клеточной терапии	90
<i>Юлия Игоревна Елисеева</i> Органы на чипе как альтернатива традиционным моделям клеточных культур и животных	86	<i>Анастасия Юрьевна Ефименко, Анна Григорьевна Сорокина, Ольга Александровна Григорьева, Екатерина Сергеевна Новоселецкая, Наталья Андреевна Басалова, Наталья Андреевна Александровна Шкина, Наталья Игоревна Калинина, Яна Артуровна Орлова, Елена Викторовна Парфенова, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i> Участие не кодирующих регуляторных РНК, секретируемых мезенхимными стромальными клетками, в процессах регенерации и репарации тканей	90
<i>Андрей Владимирович Ельчанинов, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов</i> Макрофаги — терапевтическая мишень для стимуляции репаративных процессов	86	<i>Богдан Эдуардович Ефименко, Константин Андреевич Прокин</i> Глубокое обучение для трекинга мультипотентных стволовых клеток в тестировании материалов биомедицинского назначения	91
<i>Алексей Михайлович Емелин, Денис Олегович Був, Александра Алексеевна Слабикова, Иван Антонович Яковлев, Роман Вадимович Деев</i> Количественная оценка миогенной дифференцировки клеточной линии С2С12 с использованием полиэтиленгликоля и индукционных сред in vitro	87	<i>Жулдызай Алдановна Жанатаева, Алия Зейнуллаевна Оспанова, Ольга Владимировна Ульянова, Дина Александровна Серебренникова</i> Трансплантация фетальных островковых клеток поджелудочной железы человека при сахарном диабете I типа	91
<i>Алексей Емелин, Лиля Шувалова, Александра Слабикова, Денис Був, Екатерина Козырева, О. Лебедева, Артем Еремеев, Роман Деев</i> Оценка нейрогистогенеза при культивировании клеток с индуцированной плюрипотентностью в составе органоидов мозга	87	<i>Иван Владимирович Живодерников, Андрей Юрьевич Ратушный, Диана Константиновна Матвеева, Людмила Борисовна Буравкова</i> Экспрессия генов внеклеточного матрикса МСК in vitro при моделировании эффектов микрогравитации	92
<i>Илья Игоревич Еремин, Иван Николаевич Корсаков, Анастасия Петровна Петрикина, Татьяна Сергеевна Чаузова, Ольга Сергеевна Гринаковская, Галия Равиловна Сетдикова, Оксана Владимировна Паклина, Андрей Алексеевич Пулин</i> Сравнительная оценка терапевтической эффективности клеточных продуктов	88	<i>Борис Давидович Животовский</i> Регенерация, гибель клеток и рак	92
<i>Илья Игоревич Еремин, Ирина Ивановна Надеяева, Вячеслав Сергеевич Васильев</i> Статус стромально-васкулярной фракции жировой ткани как клеточного продукта в современных реалиях отечественного правового поля	88	<i>Мargarита Николаевна Журавлева, Эльвира Руслановна Ахметзянова, Александр Александрович Костенников, Яна Олеговна Мухамедшина</i> Изменение в поведении клеток микроглии на моделях травмы спинного мозга in vivo	92
<i>Р.Ю. Еремичев, М.А. Кулебякина, П.П. Нимирицкий, М.Г. Егизарян, Н.А. Александровна Шкина, П.И. Макаревич</i> Изменение стромальных клеток под действием менструальной жидкости в контексте заживления эндометрия	89	<i>Кирилл Эдуардович Журенков, Ольга Игоревна Александрова, Илья Олегович Гаврилюк, Светлана Алексеевна Александрова, Наталья Михайловна Ярцева, Татьяна Вячеславовна Машель, Юлия Игоревна Хорольская, Галина Алексеевна Писугина, Дарья Александровна Переплетчикова, Миральда Ивановна Блинова</i> Стволовые клетки слизистой нижней губы в тканевой инженерии роговицы глаза	93
<i>Виктория Вячеславовна Ерофеева, Виктор Васильевич Глебов, Елизавета Вячеславовна Аникина, Ксения Юрьевна Михайличенко, Гульнара Александровна Кулиева, Светлана Васильевна Горюнова</i> Апоптоз: регуляция клеточной смерти содержащими белками	89		

<i>Николай Александрович Забокрицкий</i> Доклинические исследования цитопротекторных свойств штамма <i>Bacillus subtilis</i> В-9906 на модели токсического поражения клеток печени 93	<i>Юрий Валерьевич Зобков, Антон Владимирович Миронов, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Карпович Попов, Игорь Валерьевич Смирнов, Илья Ядигерович Бозо, Роман Вадимович Деев, Сергей Миронович Баринов, Владимир Сергеевич Комлев</i> Разработка биосовместимых композиционных материалов, адаптированных к технологии изготовления персонализированных биомедицинских изделий 97
<i>Елена Вадимовна Загайнова, Дарья Сергеевна Кузнецова, Светлана Алексеевна Родимова, Дмитрий Георгиевич Реунов, Александр Андреевич Гулин, Николай Викторович Бобров, Наталья Всеволодовна Вдовина, Владимир Евгеньевич Загайнов</i> Разработка нового способа интраоперационной оценки регенераторного потенциала печени на основе мультипараметрического имиджинга 94	<i>Владимир Олегович Золотухин, Александр Анатольевич Глухов, Александр Алексеевич Андреев</i> Окислительный стресс при остеомиелите после локального применения инфракрасного облучения и коллагена 97
<i>Юрий Дмитриевич Загоскин, Тимофей Евгеньевич Григорьев, Никита Михайлович Кузнецов, Валерия Сергеевна Кузнецова, Андрей Вячеславович Васильев, Татьяна Борисовна Бухарова, Дмитрий Вадимович Гольдштейн, Сергей Николаевич Чвалун</i> Биоразлагаемые композиционные материалы для челюстно-лицевой хирургии на основе полимерных гидрогелей и пористых микрочастиц полилактида 94	<i>Вадим Леонидович Зорин, Алла Ивановна Зорина, Артур Александрович Исаев</i> SPRS-терапия®: коррекция возрастных изменений кожи. Паспорт кожи 98
<i>Алла Михайловна Зайдман, Александр Игоревич Шевченко, Елена Леонидовна Строкова, Аркадий Федорович Гусев, Ирина Анатольевна Кирилова, Владимир Михайлович Субботин</i> Коррекция опорной и метаболической функции дефекта костной ткани остеотрансплантатом 95	<i>Екатерина Сергеевна Зубкова, Юрий Сергеевич Стафеев, Светлана Сергеевна Мичурина, Михаил Юрьевич Меньшиков</i> Воздействие поляризующих факторов на экспрессионный профиль и иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани 98
<i>Ирина Сергеевна Захарова, Мария Константиновна Живень, Алена Сергеевна Ступникова, Александр Игоревич Шевченко, Сурен Минасович Закиян</i> Разработка клеточных технологий для регенерации сосудов 95	<i>Дмитрий Александрович Зубов, Роман Геннадьевич Васильев, Анжела Евгеньевна Родниченко, Владимир Михайлович Оксимец, Алена Васильевна Злацкая, Ольга Сергеевна Губарь, Инна Михайловна Гордиенко, Вероника Евгеньевна Хаджинова</i> Тканевая инженерия костной ткани — клеточные и молекулярные механизмы 99
<i>Алена Игоревна Звягина, Ирина Сергеевна Фадеева, Владислав Валентинович Минайчев, Полина Олеговна Теплова, Анатолий Сергеевич Сенотов</i> Исследование биоинтеграции перикардальных барьерных мембран для направленной регенерации тканей 96	<i>Ирина Михайловна Зурина, Анастасия Алексеевна Горкун, Екатерина Витальевна Джуссоева, Настасья Владимировна Кошелева, Тамара Дмитриевна Колокольцова, Ирина Николаевна Сабурина</i> Перспектива использования сфероидов из меланоцитов в качестве тест-системы in vitro 100
<i>Алёна Васильевна Злацкая, Наталья Михайловна Тодосенко, Анжела Евгеньевна Родниченко, Инна Михайловна Гордиенко, Ольга Сергеевна Губарь, Дмитрий Александрович Зубов, Светлана Николаевна Новикова, Лариса Сергеевна Литвинова, Роман Геннадиевич Васильев</i> Разработка эффективной хепо-free системы для экспансии эндометриальных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток человека 96	<i>Анастасия Михайловна Иванова, Вадим Игоревич Чечехин, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Наталья Игоревна Калинина</i> Гетерологическая сенситизация альфа1А- адренорецепторов под действием серотонина в мезенхимных стромальных клетках 100

<i>Оксана Алексеевна Иванова, Елена Владимировна Игнатъева, Татьяна Александровна Лелявина, Виктория Леонидовна Галенко, Маргарита Юрьевна Комарова, Мария Юрьевна Ситникова, Анна Александровна Костарева, Алексей Александрович Сергушичев, Рената Игоревна Дмитриева</i> Исследование дифференциальной экспрессии и сигнальных путей в скелетной мускулатуре пациентов с ХСН после физической реабилитации	101	<i>Гиляна Константиновна Казакова, Татьяна Викторовна Сафронова, Ирина Ивановна Селезнева, Владимир Валентинович Зайцев, Снежана Алексеевна Тихонова</i> Резорбируемая биокерамика в системе Ca ₂ P ₂ O ₇ – Mg ₂ P ₂ O ₇ , полученная с использованием стереолитографической печати с заданной архитектурой порового пространства	104
<i>Андрей Александрович Измайлов, Максим Сергеевич Кузнецов, Артур Николаевич Лисюков, Ильнара Альбертовна Бикмуллина, Константин Дмитриевич Волков, Филип Олегович Фадеев, Рустем Робертович Исламов</i> Функциональное состояние генов, кодирующих синаптические белки в спинном мозге, в условиях моделирования гипогравитации на Земле	101	<i>Илья Борисович Казанцев, Александр Иванович Цуканов, Владимир Владимирович Иванов, Ольга Александровна Кайдаш, Анна Сергеевна Жевняк</i> Применение стромально-васкулярной клеточной фракции в префабрикации перфорантных лоскутов	104
<i>Рустем Робертович Исламов, Элима Арбиевна Агатиева, Ильназ Марсельевич Газизов, Саид Сальменович Ксембаев, Татьяна Михайловна Андреева, Дмитрий Эдуардович Цыплаков, Михаил Евгеньевич Соколов, Ваге Аршалуйсович Маркосян, Тафкиль Такиевич Фаизов, Фарид Вагизович Баширов</i> Способ моделирования флегмоны окологлазничной области у крысы	102	<i>Екатерина Павловна Калабушева, Элина Сергеевна Чермных, Андрей Александрович Рябинин, Екатерина Андреевна Воротеяк</i> Реконструкция волосяного фолликула человека: перспективы перехода от трехмерных органотипических культур к заместительной терапии	105
<i>Рустем Робертович Исламов, Михаил Евгеньевич Соколов, Исскандер Азатович Мунасипов, Алмаз Талгатович Салихов, Ильфат Фаридович Галаятдинов, Ваге Аршалуйсович Маркосян, Евгений Сергеевич Ким, Дмитрий Александрович Трофимов, Арслан Русланович Хамитов, Андрей Александрович Измайлов, Михаил Самуилович Левин, Зуфар Зуфарович Сафиуллов</i> Разработка модели ишемического инсульта головного мозга на мини-свиньях	102	<i>Евгения Юрьевна Кананыхина, Галина Борисовна Большакова, Татьяна Владимировна Шмакова</i> Экспрессия металлопротеиназ и коллагенов I и III типа при заживлении кожной раны на животе и спине крыс	105
<i>Рустем Робертович Исламов, Филип Олегович Фадеев, Фарид Вагизович Баширов, Ваге Аршалуйсович Маркосян, Михаил Евгеньевич Соколов, Андрей Александрович Измайлов, Мария Александровна Давлеева, Роман Васильевич Шевченко, Тагир Фархатович Минекаев, Дамир Ринатович Ибрагимов, Анастасия Тимуровна Халитова, Юлия Александровна Калистратова</i> Изучение эффективности клеточно-опосредованной генной терапии в сочетании с эпидуральной электростимуляцией на морфо-функциональное восстановление спинного мозга мини-свиньи с контузионной травмой	103	<i>Анастасия Александровна Капуста, Николай Викторович Первушин, Борис Давидович Животовский, Гелина Сергеевна Копейна</i> Пост-трансляционные модификации каспазы-2 как механизм регуляции её функции в опухолевых клетках	106
<i>Мариами Георгиевна Кавиладзе</i> Применение 3D-опухолевых сфероидов в Drug Discovery	103	<i>Максим Николаевич Карагяур, Данияр Таалайбекович Дыйканов, Мария Никитична Скрябина, Карина Дмитриевна Рысенкова, Екатерина Владимировна Сёмина, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Создание и тестирование генетической конструкции для CRISPR-опосредованного «выключения» регуляторных последовательностей генома, генов некодирующих РНК и генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм	106
		<i>Максим Николаевич Карагяур, Александра Ивановна Ростовцева, Вадим Юрьевич Балабаньян, Полина Сергеевна Климович, Екатерина Владимировна Семина, Дмитрий Викторович Стамбольский</i> Бицистронная генетическая конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор и урокиназный активатор плазминогена, стимулирует восстановление поврежденного нерва	107

<i>Максим Николаевич Карагяур, Александра Ивановна Ростовцева, Светлана Александровна Литвинова, Сталик Станиславович Джауари, Вадим Юрьевич Балабаньян, Екатерина Владимировна Сёмина, Максим Валерьевич Мнихович, Анастасия Юрьевна Ефименко, Дмитрий Викторович Стамбольский</i>	
Нейропротективная активность комбинации мозгового нейротрофического фактора и урокиназного активатора плазминогена при геморрагическом инсульте: исследование proof-of-concept	107
<i>Павел Анатольевич Каралкин, Ирина Константиновна Свиридова, Валентина Александровна Кирсанова, Сурая Абдулаевна Ахмедова, Ярослав Дмитриевич Шанский, Елизавета Константиновна Нежурина, Ирина Александровна Замулаева, Надежда Николаевна Волченко, Наталья Сергеевна Сергеева, Андрей Дмитриевич Каприн</i>	
Возможные риски применения прогениторных клеток жировой ткани у пациентов с онкологическими заболеваниями	108
<i>Ирина Сергеевна Кашапова, Елена Сергеевна Щукина, Глеб Юрьевич Косовский</i>	
Пролиферация и дифференцировочный потенциал мезенхимных стволовых клеток кролика в присутствии FGF	108
<i>Любовь Андреевна Кияшова, Татьяна Сергеевна Демина, Никита Владимирович Минаев, Татьяна Николаевна Попырина, Семен Николаевич Чурбанов, Светлана Анатольевна Минаева, Christian Grandfils, Татьяна Анатольевна Акопова, Петр Сергеевич Тимашев</i>	
Поверхностно-селективное лазерное спекание: от микрочастиц до 3D структур	109
<i>Борис Ким, Мария Сергеевна Ребенкова, Юлия Викторовна Роговская, Александра Энхэевна Гомбожапова, Вячеслав Валерьевич Рябов</i>	
Динамика инфильтрации миокарда IL-10+/Stabilin 1+ макрофагами в процессе постинфарктной репарации миокарда	109
<i>Ирина Иннокентьевна Ким, Александр Петрович Лыков, Мария Александровна Суворцева, Ольга Владимировна Повещенко, Наталья Анатольевна Бондаренко, Евгения Викторовна Янкайте</i>	
Влияние плазмы пациентов с трофическими язвами на функции дермальных фибробластов, мезенхимальных стволовых и эндотелиальных клеток	110
<i>Владимир Игоревич Кирпатовский, Сергей Алексеевич Голованов, Вера Васильевна Дрожжева, Геннадий Дмитриевич Ефремов, Эдуард Зиновьевич Рабинович, Михаил Александрович Соколов</i>	
Стимуляция регенерации и восстановления функции почки после ее ишемического повреждения с использованием белково-пептидного комплекса эмбриональных тканей	110
<i>Кристина Китаева, Дарья Чулпанова, Тихон Прудников, Севиндж Клетухина, Альберт Ризванов, Валерия Соловьева</i>	
Анализ взаимодействия и устойчивости к цисплатину опухолевых, иммунных и стромальных клеток в ко-культуре	111
<i>Илья Дмитриевич Клабуков</i>	
Формальные подходы к функциональному проектированию тканеинженерных конструкций	111
<i>Наталья Владимировна Клементьева, Владимир Сергеевич Попов, Артур Александрович Исаев, Сергей Львович Киселев</i>	
Получение улучшенного варианта вектора для генной терапии X-сцепленной аденолейкодистрофии	112
<i>Полина Сергеевна Климович, Екатерина Владимировна Семина</i>	
Взаимодействие рецептора урокиназы uPAR с рецептором хемокинов FPRL регулирует направление роста аксонов	112
<i>Алексей Вячеславович Ковалев</i>	
Ин vivo биореактор для органотипической регенерации кожи	113
<i>Ирина Викторовна Кожухарова, Наталья Михайловна Минкевич, Лариса Леонидовна Алексеенко, Ирина Сергеевна Смирнова, Валерий Всеволодович Зенин, Николай Николаевич Никольский</i>	
Влияние экзогенных и эндогенных факторов на экспрессию VEGF в культивируемых in vitro мезенхимных стволовых клетках человека	113
<i>Екатерина Петровна Колеватых</i>	
Влияние метабиотических препаратов на регенеративные процессы у экспериментальных животных	114
<i>В.А. Колесникова, Н.С. Самойленкова, Е.А. Савченко, С.Р. Дрозд, А.В. Ревизин, Г.В. Павлова</i>	
Исследование значимости маркера CD133 в пролиферативном потенциале клеток глиобластомы и поиск путей управления пролиферацией и дифференцировкой этих клеток	114
<i>Ирина Вячеславовна Кологривова, Татьяна Евгеньевна Суслова, Вячеслав Валерьевич Рябов, Марина Александровна Штатолкина, Оксана Александровна Трубачева</i>	
Динамика ядерной транслокации транскрипционного фактора FoxP3 в CD4 ⁺ лимфоцитах и субпопуляционный состав моноцитов после перенесенного инфаркта миокарда	115

<i>Мargarита Юрьевна Комарова, Оксана Алексеевна Иванова, Елена Владимировна Игнатъева, Рената Игоревна Дмитриева</i> S2C12 как модель для изучения дегенерации мышечного волокна при ламинопатиях	115	<i>Мария Константиновна Корнейко, Ирина Александровна Ляхова, Сергей Викторович Зайцев, Игорь Степанович Брюховецкий</i> Взаимодействие гемопоэтических стволовых клеток и клеток глиобластомы, стимулированных TGF- β 1 in vitro	119
<i>Анастасия Валерьевна Комова, Константин Владимирович Дергилев, Зоя Ивановна Цоколаева, Елизавета Израилевна Ратнер, Елена Викторовна Парфенова</i> Характеристика прогениторных клеток эпикарда из неонатальных сердец мыши	116	<i>Дарья Григорьевна Коровина, Ирина Петровна Савченкова</i> Сравнительный анализ эффективности различных индукторов для миогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стволовых клеток крупного рогатого скота	119
<i>Екатерина Владимировна Кондратьева, Яна Сергеевна Слесаренко, Эльмира Пайзутдиновна Адильгереева, Елена Львовна Амелина, Вячеслав Юрьевич Табаков, Арина Артуровна Анучина, Кирилл Дмитриевич Устинов, Матвей Ильич Ясиновский, Миляуша Иршатова Зайнитдинова, Екатерина Сергеевна Воронина, Александр Вячеславович Лавров, Светлана Анатольевна Смирнихина</i> Получение ИПСК от пациентов с муковисцидозом и редактирование мутации F508del в гене CFTR с помощью CRISPR/Cas9	116	<i>Анна Геннадьевна Коротких, Сергей Владимирович Сазонов</i> Ультраструктурные проявления репаративной регенерации миелиновых нервных волокон при использовании в кондуите нерва углеродных нанотрубок	120
<i>Михаил Анатольевич Коноплянников, Виктор Юрьевич Тимошенко, Юлия Валерьевна Каргина, Гаухар Маратовна Юсубалиева, Владимир Анатольевич Кальсин, Анатолий Георгиевич Коноплянников, Владимир Павлович Баклаушев, Петр Сергеевич Тимашев</i> Комплекс салиномицина с наночастицами кремния эффективно ингибирует опухолевой рост in vitro и in vivo	117	<i>Артём Владимирович Коротков, Евгений Александрович Шуман, Олег Германович Макеев, Елизавета Анатольевна Яковлева</i> Трёхмерная конструкции хряща, полученная из аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	120
<i>Константин Вячеславович Коньшев, Сергей Владимирович Сазонов</i> Взаимосвязь изменений уровней экспрессии маркера пролиферации Ki67 и рецепторов к эстрогену при регионарном метастазировании рака молочной железы	117	<i>Светлана Михайловна Космачева, Михаил Петрович Потапнев</i> Остеогенная индукция мезенхимальных стволовых клеток человека на наноструктурированных покрытиях диоксидтитановых имплантатов	121
<i>Алексей Николаевич Кораблев, Инна Евгеньевна Пристяжнюк, Юлия Михайловна Минина, Ирина Александровна Серова, Вениамин Семенович Фишман, Мария Михайловна Гридина, Timofey Rozhdestvensky, Leonid Gubar, Boris Skryabin, Олег Леонидович Серов</i> Происхождение и судьба масштабных хромосомных перестроек, индуцированных технологией CRISPR/Cas9 у мышей: от зигот до соматических клеток	118	<i>Александр Костенников, Margarita Журавлева, Ильяс Кабдеш, Эльвира Ахметзянова</i> Изменения в цитокиновом профиле сыворотки крови крыс с различными степенями травмы спинного мозга	121
<i>Анастасия Викторовна Корель, Александр Геннадьевич Самохин, Василий Алексеевич Кузнецов, Екатерина Олеговна Землякова, Вадим Олегович Ткаченко, Александр Викторович Пестов</i> Изучение биосовместимости гелей на основе производных карбоксиалкилхитозанов либо полиалкиленкарбонатов в эксперименте in vitro	118	<i>Елена Геннадьевна Костоломова</i> Роль процессов пролиферации и апоптоза в образовании рубцовой ткани	121
		<i>Наталья Валериевна Костюк, Михаил Витальевич Черноруцкий, Майя Борисовна Белякова, Михаил Владимирович Миняев, Margarita Борисовна Петрова</i> Изменение состава смешанной популяции остеогенных клеток в долгосрочной культуре ...	122
		<i>Валентин Валентинович Кочервинский, Олег Валерьевич Градов, Margarita Алексеевна Градова</i> Применение сегнетоэлектрических полимеров в регенеративной медицине	122
		<i>Екатерина Николаевна Кочкина, Полина Дмитриевна Котова</i> Протеинкиназа G модулирует чувствительность МСК к пуринергическим агонистам	123

<i>Настасья Владимировна Кошелева, Инна Вячеславовна Ильина, Ирина Михайловна Зурина, Анастасия Алексеевна Горкун, Дмитрий Сергеевич Ситников, Михаил Борисович Агранат, Сергей Георгиевич Морозов, Петр Сергеевич Тимашев, Ирина Николаевна Сабурина</i> Лазерная микрохирургия клеточных сфероидов для регенеративной медицины	123	<i>Екатерина Алексеевна Кувшинова, Наталия Валерьевна Петракова, Валентина Анатольевна Волченкова, Ирина Константиновна Свиридова, Сурая Абдулаевна Ахмедова, Наталья Сергеевна Сергеева, Владимир Сергеевич Комлев</i> Функционализация кальцийфосфатных материалов противоопухолевым препаратом цисплатином	128
<i>Настасья Владимировна Кошелева, Ирина Николаевна Сабурина, Ирина Михайловна Зурина, Анастасия Алексеевна Горкун, Илья Игоревич Еремин, Андрей Алексеевич Пулин, Вадим Леонидович Зорин, Павел Борисович Копнин</i> Мультipotентные мезенхимные стромальные клетки десны как новый источник аутологичных миобластов	124	<i>Василий Андреевич Кудинов, Константин Константинович Баскаев</i> Реконструированные липопротеины высокой плотности в качестве системы доставки для репрограммирования клеток и тканей	128
<i>Ирина Александровна Красильникова, Оксана Юрьевна Лисина, Максим Витальевич Балясин, Ринат Рашидович Шарипов, Ш.К. Сулейманов, Даниил Андреевич Фролов, Всеволод Григорьевич Пинелис, Александр Михайлович Сурин</i> Регенерация нейрональной сети в области механической травмы в первичной культуре клеток коры мозга крысы	125	<i>Сергей Кузин</i> Генетическая нестабильность при нарушении пространственной и временной организации стволовых клеток	129
<i>Виталий Викторович Краснов, Игорь Васильевич Матвейчук, Владимир Викторович Розанов, Юрий Юрьевич Литвинов</i> Оптимизация качества поверхностного слоя костных имплантатов с целью повышения их регенеративного потенциала	125	<i>Константин Анатольевич Кузнецов, Вера Сергеевна Черноносова, Борис Павлович Челобанов, Андрей Анатольевич Карпенко, Павел Петрович Лактионов</i> Лекарственно-наполненное покрытие для баллонорасширяемых сосудистых стентов	129
<i>Михаил Сергеевич Краснов, Астемир Икрамович Шайхалиев, Евгений Владимирович Коршаков, Виктория Петровна Ямскова, Владимир Иосифович Лозинский</i> Об особенностях восстановления костной ткани крысы после заполнении искусственного дефекта криогенно-структурированной биополимерной губкой, содержащей биорегулятор	126	<i>Алла Викторовна Кузнецова, Любовь Александровна Ржанова, Александр Михайлович Куринов</i> Влияние оФРФ на сигнальные пути и дифференцировку клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека	130
<i>Наталья Дмитриевна Крещенко</i> Планарии как биологическая модель для изучения дифференцировки стволовых клеток	126	<i>Андрей Кузьмин, Вероника Ермакова, Алексей Томилин</i> Создание системы для автоматического детектирования экспрессии гена Oct4 in vivo и in vitro	130
<i>Анастасия Кручинина, Юлия Юдичева, Алексей Венедиктов</i> Исследование децеллюляризованных матриц ксеногенного происхождения в тестах in vitro и in vivo	127	<i>Константин Юрьевич Кулебякин, Никита Сергеевич Волошин, Антон Александрович Картошкин, Дмитрий Кузьмич Мартынов</i> Иммортализованные клеточные линии демонстрируют сниженный дифференцировочный потенциал в сравнении с первичными культурами клеток человека	131
<i>Павел Андреевич Крылов</i> Анализ 3D-реконструкций коленного сустава крысы при экспериментальном остеоартрозе	127	<i>Константин Юрьевич Кулебякин, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Никита Сергеевич Волошин, Александра Владимировна Степанова</i> Сниженный адипогенный потенциал МСК, полученных от доноров с инсулинорезистентностью	131
		<i>Сирин Василевна Курангалеева, Ольга Андреевна Неустроева, Альберт Анатольевич Ризванов, Марина Олеговна Гомзикова</i> Доставка специфичных мембранных рецепторов в клетки-мишени с помощью искусственных микровезикул	132

- Александр Витальевич Курков, Анна Евгеньевна Гуллер, Леонид Прокофьевич Истранов, Елена Викторовна Истранова, Семен Николаевич Чурбанов, Петр Сергеевич Тимашев, Денис Викторович Бутнару, Анатолий Борисович Шехтер*
Структурные и механические особенности, биосовместимость, биодеградация и тканевая реакция на имплантацию коллагеновых скаффолдов для тканевой инженерии 132
- Александр Владимирович Лайков, Юлия Джафаровна Романова, Дилара Зильбаровна Гатина, Ильнур Ильдусович Салафутдинов*
Протеомное профилирование для оценки и тестирования рекомбинантных аденовирусов 133
- Анастасия Юрьевна Лаптиева, Александр Алексеевич Андреев, Антон Петрович Остроушко*
Влияние вариантов введения цианкобаламина на пострезекционную регенерацию печени в эксперименте 133
- Георгий Евгеньевич Леонов, Диана Ирековна Салихова, Татьяна Борисовна Бухарова, Зоя Валентиновна Корниенко, Наталья Вадимовна Булатенко, Олег Владимирович Махнач, Андрей Витальевич Макаров, Тимур Хайсамутдинович Фатхудинов, Сергей Львович Киселев, Дмитрий Вадимович Гольдштейн*
Сравнительный анализ нейротрофических и нейропротекторных свойств нейрональных, глиальных предшественников и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток 134
- Наталья Владимировна Лизунова, Занда Валериевна Бакаева, Екатерина Андреевна Ивукина, Вячеслав Игоревич Дамулин, Артемий Александрович Шлычков, Никита Владимирович Минаев, Татьяна Сергеевна Демина, Ксения Николаевна Бардакова, Петр Дмитриевич Брежестовский, Петр Сергеевич Тимашев, Всеволод Григорьевич Пинелис, Александр Михайлович Сурин*
Нейрорепаративный потенциал тканеинженерной конструкции из гидрогеля на основе привитого сополимера хитозана с олиго (L,L-лактидом) и ИПСК человека в модели травмы головного мозга у мышей ... 134
- Юлия Владимировна Лискова, Александр Абрамович Стадников, Антон Николаевич Новиков, Светлана Петровна Саликова*
Сердечные телоциты: роль в репарации/регенерации миокарда 135
- Юрий Юрьевич Литвинов, Игорь Васильевич Матвейчук, Владимир Викторович Розанов*
Современные подходы к оптимизации технологии получения костных имплантатов ... 135
- Владимир Иосифович Лозинский*
Возможности криогенного структурирования биополимеров в плане создания макропористых матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины 136
- Александр Петрович Лыков, Ольга Владимировна Повещенко, Мария Александровна Суровцева, Наталья Анатольевна Бондаренко, Ирина Иннокентьевна Ким*
Влияние полиэтилентерефталата и политетрафторэтилена на функциональные свойства эндотелиальных и мезенхимных клеток 136
- Александр Петрович Лыков, Мария Александровна Суровцева, Ольга Владимировна Повещенко, Наталья Анатольевна Бондаренко, Ирина Иннокентьевна Ким, Ольга Михайловна Станишевская, Дмитрий Валерьевич Черных, Наталья Сергеевна Арбеньева, Владимир Иванович Братко, Александр Николаевич Трунов, Валерий Вячеславович Черных*
Лизат тромбоцитов в лечении возрастной макулярной дегенерации 137
- Александр Петрович Лыков, Мария Александровна Суровцева, Ольга Владимировна Повещенко, Наталья Анатольевна Бондаренко, Ирина Иннокентьевна Ким, Евгения Викторовна Янкайте*
Эффект плазмы больных трофическими язвами на функциональные свойства, клеток вовлеченных в заживление ран 137
- Александр Петрович Лыков, Мария Александровна Суровцева, Ольга Владимировна Повещенко, Наталья Анатольевна Бондаренко, Ирина Иннокентьевна Ким, Евгения Владимировна Янкайте*
Эритропоэтин как стимулятор терапевтического потенциала мезенхимных стволовых клеток 138
- Ольга Геннадьевна Люблинская, Николай Николаевич Никольский*
Молекулярно-функциональный профиль и терапевтический потенциал мезенхимных стволовых клеток эндометрия, культивируемых в сфероидах 138
- Ирина Ляхова, Корнейко Мария, Зайцев Сергей, Брюховецкий Игорь, Хотимченко Юрий*
G-CSF усиливает экспрессию TGF- β в ткани опухоли экспериментальной модели глиобластомы у крыс 139
- Рони Бахаэддин Маи, Егор Олегович Осидак, Екатерина Сергеевна Мишина, Владимир Евгеньевич Попов, Сергей Петрович Домогатский*
Применение коллагеновой мембраны для пластики твердой мозговой оболочки (экспериментальное исследование) 139

<i>Павел Игоревич Макаревич, Анастасия Юрьевна Ефименко, Елена Викторовна Парфёнова, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i> Тканеспецифичные мультипотентные стромальные клетки как организаторы процесса восстановления ткани после повреждения	140	<i>Тюяна Баировна Маланханова, Елена Викторовна Григорьева, Любовь Александровна Сульдина, Ксения Николаевна Морозова, Елена Владимировна Киселева, Сурен Минасович Закиян, Анастасия Александровна Малахова</i> Исследование мутантного фенотипа изогенной клеточной модели болезни Хантингтона	144
<i>Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев</i> Эффект применения раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами, при лечении глубоких ран в эксперименте	140	<i>Анна Борисовна Малашичева, Александра Станиславовна Костина, Дарья Сергеевна Семенова</i> NOTCH-зависимые механизмы остеогенной дифференцировки клеток	144
<i>Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев</i> Содержание репаративных факторов в бедной и богатой тромбоцитами плазме	141	<i>Ольга Сергеевна Манжуло, Инесса Валерьевна Дюйзен, Игорь Викторович Манжуло</i> Докозагексаеновая кислота модулирует микроглиальную/ макрофагальную активность при компрессионной травме спинного мозга крыс	144
<i>Максим Сергеевич Макаров, Майя Викторовна Сторожева, Наталья Валерьевна Боровкова, Иван Николаевич Пономарев, Юлий Вадимович Андреев</i> Наночастицы серебра снижают секрецию ростовых факторов в адгезирующих тромбоцитах	141	<i>Ирина Ильинична Марахова, Алиса Павловна Домнина, Наталья Алексеевна Пуговкина, Алла Николаевна Шатрова, Николай Николаевич Никольский</i> Внутриклеточное содержание калия и пролиферация мезенхимных стволовых клеток человека	145
<i>Сергей Владимирович Макаров</i> Отдаленные результаты лечения больного с миастенией после высокодозной иммуносупрессивной терапии и аутотрансплантации стволовых кроветворных клеток (ВИСТ АТ). Клиническое наблюдение	142	<i>Александра Олеговна Марияцац, Роман Александрович Акасов, Антон Владимирович Миронов, Анастасия Владимировна Сочилина, Александр Георгиевич Савельев, Евгений Валерьевич Хайдуков, Владимир Карпович Попов</i> 3D прайнтинг гиалуроновых матриц для тканеинженерных конструкций	145
<i>Олег Германович Макеев, Артем Владимирович Коротков, Ольга Алексеевна Сатонкина</i> Перспективы использования трансдифференцированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), для коррекции печеночной недостаточности	142	<i>Елена Александровна Маркина, Ирина Вячеславовна Андрианова, Елена Викторовна Сотнезова, Людмила Борисовна Буравкова</i> Реакция прогениторных клеток костного мозга грызунов на действие факторов космического полета и моделирования их эффектов	146
<i>Надежда Викторовна Максимова, Михаил Евгеньевич Крашенинников, Игорь Анатольевич Помыткин, Илья Дмитриевич Клабуков, Анна Валентиновна Миченко, Галина Афанасьевна Мельниченко, Алексей Валерьевич Ляндуп</i> Долгосрочные результаты применения малых доз аутологичных мезенхимальных стромальных клеток при лечении диабетических язв	143	<i>Юлия Владимировна Маркитантова, Владимир Николаевич Симирийский</i> Особенности структурной организации и специфичность экспрессии гомеобокс-содержащих генов и их изоформ как основа различий регенерационных ответов	146
<i>Серафима Юрьевна Максимова, Анушаван Оганесович Папоян, Ксения Владимировна Данилко, Тимур Ильдусович Биккузин, Амир Рафисович Фарганов, Валентин Николаевич Павлов</i> Использование стромально-васкулярной фракции, полученной из аутологичной жировой ткани, для лечения стрессового недержания мочи у мужчин	143	<i>Ваге Аршалуйсович Маркосян, Михаил Евгеньевич Соколов, Евгений Сергеевич Ким, Дмитрий Александрович Трофимов, Айрат Мансурович Гибадуллин, Грайр Грайрович Кундакчян, Андрей Александрович Измайлов, Максим Сергеевич Кузнецов, Равиль Расимович Гарифуллин, Артем Анатольевич Суриков, Регина Ринатовна Миннигалева</i> Сравнительный анализ морфо-функциональных сдвигов в головном мозге крыс после моделирования ишемического инсульта различными способами	147

<i>Диана Константиновна Матвеева, Елена Ромуальдовна Андреева</i> Оптимизация протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека 147	<i>Ксения Андреевна Меньших, Вера Владимировна Воинова, Татьяна Константиновна Махина, Гарина Александровна Бонарцева, Константин Вольдемарович Шайтан, Антон Павлович Бонарцев</i> Экспериментальная модель роста опухолевых клеток на микросферах из поли-3- оксипутирата 151
<i>Сергей Петрович Медведев, Эльвира Махаловна Байрамова, Динара Витальевна Шарипова, Виктория Романовна Коваленко, Елена Викторовна Григорьева, Сурен Минасович Закиян</i> Создание трансгенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предназначенных для изучения молекулярно- генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона и тестирования перспективных лекарственных соединений 148	<i>Никита Владимирович Минаев</i> Применение лазерных технологий для формирования скаффолдов и биопечати 152
<i>Всеволод Викторович Мелехин, Анна Владимировна Щеглова, Олег Германович Макеев</i> Индукцированная гиперэкспрессия гена KLOTNO подавляет рост клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека 148	<i>Владислав Валентинович Минайчев, Полина Олеговна Теплова, Ксения Андреевна Меньших, Ирина Сергеевна Фадеева, Алёна Игоревна Звягина, Алина Сергеевна Одинцова, Владимир Семёнович Акатов</i> Повышение остеоиндуктивных свойств наноразмерного гидроксиапатита в его сочетании с остеокондуктивным коллагеновым матриксом 152
<i>Александра Викторовна Мелешина, Светлана Алексеевна Родимова, Дмитрий Георгиевич Реунов, Екатерина Павловна Калабушева, Эрдэм Баирович Дашиинимаев, Екатерина Андреевна Воротеляк, Елена Вадимовна Загайнова</i> Новые структурно-функциональные маркеры в оценке эффективности различных дифференцировок стволовых клеток 149	<i>Светлана Михайловна Мирошниченко, Анастасия Олеговна Соловьева, Иван Федорович Усынин</i> АроА-1 способствует сохранению жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток в неблагоприятных условиях культивирования 153
<i>Карина Игоревна Мелконян, Александр Сергеевич Сотниченко, Ирина Валерьевна Гилевич, Татьяна Викторовна Русинова, Яна Андреевна Юцкевич, Антон Владимирович Каракулев, Сергей Борисович Богданов, Илья Михайлович Быков, Владимир Алексеевич Порханов, Андрей Николаевич Редько, Сергей Николаевич Алексеенко</i> Сравнительная характеристика результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов кожи свиньи 150	<i>Вячеслав Юрьевич Михайличенко, Сергей Александрович Самарин</i> Индукция репаративного морфогенеза и адаптационных резервов в ишемизированном миокарде при использовании мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга различного фенотипа в эксперименте ... 153
<i>Алексей Гаврилович Мензоров, Константин Евгеньевич Орищенко, Мария Михайловна Гридина, Вениамин Семенович Фишман, Олег Леонидович Серов, Анна Александровна Кашеварова, Татьяна Владимировна Никитина, Игорь Николаевич Лебедев</i> Использование тимидинкиназы для отрицательной селекции индуцированных плюрипотентных стволовых клеток 150	<i>Вячеслав Михайлович Михайлов, Анастасия Владимировна Соколова, Елена Васильевна Каминская, Надежда Степановна Скрипкина, Наталья Александровна Тимонина, Виолетта Васильевна Кравцова, Игорь Ильич Кривой</i> Немиэлоаблативная трансплантация клеток костного мозга как способ клеточной терапии моноклонных заболеваний 154
<i>Михаил Юрьевич Меньшиков, Екатерина Сергеевна Зубкова, Юрий Сергеевич Стафеев, Светлана Сергеевна Мичурина</i> Воздействие модуляторов клеточного сигналинга, энергетического метаболизма и аутофагии на экспрессионный профиль поляризованных макрофагов 151	<i>Илья Александрович Михайлов, Наталья Владимировна Данилова, Нина Александровна Олейникова, Павел Георгиевич Мальков, Нуршат Минуллаевич Гайфуллин</i> Регенераторный потенциал воспалительного ответа в перитуморальной области при раке желудка 154
	<i>Николай Васильевич Михайловский, Елена Вячеславовна Абакушина, Ольга Николаевна Спиченкова, Михаил Александрович Сигов, Герман Анатольевич Давыдов</i> Оценка миграции активированных лимфоцитов у онкологических больных при проведении иммунотерапии 155

<i>Марк Васильевич Михальченко, Мария Сергеевна Ребенкова, Александра Энхэвэна Гомбожапова, Марина Ринатовна Патышева, Юлия Викторовна Роговская, Вячеслав Валерьевич Рябов</i>		<i>Ирина Юрьевна Морина, Елена Викторовна Михайлова, Ирина Владимировна Романова</i>	
Функциональная активность макрофагов in vitro у больных острым инфарктом миокарда	155	Иммуногистохимическое исследование орексинергической системы мозга крысы после ишемического поражения	159
<i>Елена Владимировна Михальчик, Ольга Владимировна Морозова, Айнур Гашамовна Матвеева, Олег Михайлович Панасенко, Татьяна Валерьевна Цимбаленко, Аида Гусейхановна Гаджигорова, Дмитрий Владимирович Клинов</i>		<i>Яна Вячеславовна Морозова, Дмитрий Владимирович Устюжанин, Мераб Арчилович Шария, Анатолий Болеславович Смулевич, Владимир Николаевич Смирнов</i>	
Экспрессия генов цитокинов в фолликулах волос человека	156	Применение концентрата ядродержащих клеток пуповинной крови и оценка активации головного мозга с помощью fMPT у больных простой формой шизофренией с явлениями астенического дефекта в состоянии ремиссии	160
<i>Полина Викторовна Михеева, Анастасия Юрьевна Тетерина, Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев</i>		<i>Елизавета Юрьевна Москалева, Елена Соломоновна Жорова, Юлия Павловна Семочкина, Валентина Георгиевна Шуватова, Алла Валерьевна Родина, Владимир Павлович Сапрыкин</i>	
Метод биомиметического осаждения из физиологических растворов на гранулы октакальциевого фосфата для внедрения биологических факторов	156	Влияние мезенхимных стволовых клеток из разных тканей мыши на рост опухолей	160
<i>Анастасия Сергеевна Миценук, Елена Вячеславовна Абакушина</i>		<i>Екатерина Александровна Назарова, Светлана Ивановна Кривенко, Екатерина Геннадьевна Петровская, Евгения Алексеевна Примакова, Алла Александровна Сыманович</i>	
Влияние витрификации на морфологию и жизнеспособность ооцитов млекопитающих	157	Оценка влияния островков Лангерганса и мезенхимальных стволовых клеток на субпопуляционный состав лимфоцитов в совместных культурах	161
<i>Светлана Сергеевна Мичурина, Юрий Сергеевич Стафеев, Ирина Борисовна Белоглазова, Юлия Дмитриевна Молокотина, Екатерина Сергеевна Зубкова, Евгений Константинович Шевченко, Александр Вячеславович Воротников, Михаил Юрьевич Меньшиков, Елена Викторовна Парфенова</i>		<i>Дарья Дмитриевна Наместникова, Илья Леонидович Губский, Вероника Александровна Ревкова, Кирилл Константинович Сухинич, Павел Александрович Мельников, Диана Ирековна Салихова, Георгий Евгеньевич Леонов, Эльвира Андреевна Черкашова, Анна Николаевна Габашивили, Вероника Вячеславовна Бурунова, Игорь Викторович Вахрушев, Татьяна Борисовна Бухарова, Дмитрий Вадимович Гольштейн, Леонид Васильевич Губский, Владимир Павлович Баклаушев, Константин Никитич Ярыгин</i>	
Интерлейкин-4 регулирует поглощение глюкозы, активацию инсулиновой и STAT6-зависимой сигнализации в адипоцитах ЗТЗ-L1	157	Терапевтическая эффективность и биораспределение мезенхимальных стромальных клеток и нейральных прогениторных клеток, полученных из разных источников, после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга	161
<i>Анастасия Михайловна Мойсенович, Анастасия Юрьевна Архипова, Иван Викторович Бессонов, Андрей Сергеевич Колосов, Виктор Вячеславович Татарский, Константин Вольдемарович Шайтан, Михаил Михайлович Мойсенович</i>		<i>Юлия Александровна Нащекина, Светлана Алексеевна Александрова, Сергей Викторович Надеждин, Любовь Анатольевна Покровская, Наталья Аркадьевна Михайлова</i>	
Исследование влияния изменения механических свойств субстрата на нейрональную дифференцировку клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y	158	Тканеинженерные композитные конструкции на основе сополимеров молочной и гликолиевой кислот, фосфатов кальция и клеток для регенерации костной ткани	162
<i>Юлия Дмитриевна Молокотина, Юрий Сергеевич Стафеев, Мария Александровна Болдырева, Екатерина Сергеевна Зубкова, Зоя Ивановна Цоколаева, Екатерина Владимировна Семина, Елена Викторовна Парфенова</i>			
Совместное воздействие HGF и GDNF стимулирует рост нейритов, усиливая фосфорилирование ERK1/2	158		
<i>Анастасия Дмитриевна Монакова, Анастасия Евгеньевна Бодягина, Аида Фазилевна Муляр, Алена Игоревна Звягина</i>			
Разработка эластичных барьерных мембран для направленной регенерации тканей. Оценка степени биосовместимости in vitro	159		

<i>Татьяна Анатольевна Ненашева, Яна Викторовна Сердюк, Татьяна Павловна Герасимова, Александр Александрович Николаев, Елена Викторовна Григорьева, Ирина Владимировна Лядова</i> Макрофаги, полученные из индуцированных плюрипотентных стромальных клеток, как модель для изучения тканевых резидентных макрофагов	162	<i>Татьяна Владимировна Никитина, Анна Александровна Кашеварова, Алексей Гаврилович Мензоров, Станислав Анатольевич Васильев, Мария Михайловна Гридина, Анна Александровна Хабарова, Юлия Сергеевна Яковлева, Мария Евгеньевна Лопаткина, Марина Алексеевна Распопова, Дмитрий Александрович Дериглазов, Олег Леонидович Серов, Игорь Николаевич Лебедев</i> Дифференциальная стабильность кольцевых хромосом в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках	166
<i>Ольга Андреевна Неустроева, Александр Маазович Аймалетдинов, Сирина Василевна Курбангалеева, Альберт Анатольевич Ризванов, Марина Олеговна Гомзикова</i> Оценка иммунного ответа после внутривенного введения искусственных микровезикул	163	<i>Надежда Анатольевна Николаева, Владимир Викторович Розанов, Игорь Васильевич Матвейчук, Александр Петрович Черняев, Лия Никитична Саввинова</i> Возможности и перспективы совершенствования комбинированных методик стерилизации биоимплантатов	167
<i>Светлана Евгеньевна Нефедова, Кирилл Николаевич Новиков, Александр Николаевич Великанов, Харламгий Пантелеевич Тирас</i> Новые биофизические подходы к регистрации регенерации и фагоцитоза планарий	163	<i>Максим Владимирович Никулин, Витаутас-Юозапас Каятоно Швядас</i> Биокатализ в синтезе полиэфирамидов — перспективных биodeградируемых полимеров для медицины	167
<i>Наталья Викторовна Низяева, Масара Денилбековна Гапаева, Наталья Анатольевна Ломова, Татьяна Юрьевна Иванец, Галина Владимировна Хлестова, Олег Радомирович Баев</i> Синцитиотрофобласт как возможный источник повышения ангиотензиногена и ангиотензина II в плазме крови у женщин, страдающих преэклампсией	164	<i>Петр Петрович Нимирицкий, Роман Юрьевич Еремичев, Наталья Андреевна Александровна Шукина, Екатерина Сергеевна Новоселецкая, Георгий Дмитриевич Сагарадзе, Михаил Спартакович Арбатский, Анастасия Юрьевна Ефименко, Всеволод Арсеньевич Ткачук, Павел Игоревич Макаревич</i> Стромальные клетки способны к самоорганизации in vitro с образованием различающихся локальных микроокружений ...	168
<i>Наталья Викторовна Низяева, Анна Овиковна Карапетян, Масара Денилбековна Гапаева, Андрей Михайлович Приходько, Вероника Алексеевна Синицына, Олег Радомирович Баев</i> Повышение ангиогенеза как фактора, способствующего разрыву плодных оболочек при физиологическом течении беременности и при преждевременных родах	164	<i>Юлия Петровна Новикова, Валентина Антониновна Поплинская, Элеонора Норайровна Григорян</i> Ремоделирование сетчатки глаза в условиях органотипического культивирования in vitro и при повреждении сетчатки in vivo у низших и высших позвоночных животных	168
<i>Наталья Викторовна Низяева, Римма Алексеевна Полтавцева, Вероника Алексеевна Синицына, Ина Георгиевна Панова</i> CD68 ⁺ клетки в тканях глаза плодов человека	165	<i>Анна Никитична Новокрещенова, Нина Николаевна Буторина, Ольга Викторовна Паюшина, Ольга Николаевна Шевелева, Елена Ивановна Домарацкая</i> О механизме влияния экзосом, выделяемых мезенхимальными стромальными клетками, на миогенез in vitro	169
<i>Наталья Викторовна Низяева, Эльрад Юсифович Амирасланов, Наталья Анатольевна Ломова, Елена Леонидовна Долгополова, Марина Николаевна Наговицына, Роман Гергиевич Шмаков</i> Экспрессия tlr9 в ворсинках плаценты при задержке развития плода и преэклампсии	165	<i>Екатерина Сергеевна Новоселецкая, Ольга Александровна Григорьева, Наталья Андреевна Басалова, Константин Юрьевич Кулебякин, Мария Александровна Кулебякина, Петр Петрович Нимирицкий, Павел Игоревич Макаревич, Всеволод Арсеньевич Ткачук, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Моделирование микроокружения мезенхимных стволовых/стромальных клеток in vitro: роль внеклеточного матрикса	169
<i>Мария Петровна Никитина, Андрей Владимирович Ельчанинов, Анастасия Вячеславовна Лохонина, Андрей Витальевич Макаров, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов</i> Профили экспрессии генов, ассоциированных с воспалительными процессами, в клетках Купфера при регенерации печени	166		

<i>Екатерина Сергеевна Новоселецкая, Евгения Юрьевна Паршина, Надежда Александровна Браже, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Применение спектроскопии комбинационного рассеивания для изучения трехмерных клеточных и бесклеточных конструкций	170	<i>Дмитрий Сергеевич Островский, Максим Юрьевич Герасимов, Мадина Хетаговна Хубецова, Антон Дмитриевич Казанцев, Сергей Анатольевич Борзенко</i> Культирование клеток заднего эпителия роговицы человека с использованием биопокрытия коллагена I типа	174
<i>Артем Рустамович Нурисламов, Вениамин Семенович Фишман, Алексей Гаврилович Мензоров</i> Создание репортерного лентивирусного вектора LeGO-REX1-EGFP для отбора индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	170	<i>Галина Валериевна Павлова, Джиргала Владимировна Шамадыкова, Дмитрий Юрьевич Пантелеев, Надежда Николаевна Куст, Анастасия Александровна Чулкова, Александр Владимирович Ревизицин</i> Разнообразие GDNF и его роль для регенеративной медицины нервной системы человека	174
<i>Юрий Львович Орлов, Сергей Сергеевич Ковалев, Артур Игоревич Дергилев, Роман Олегович Бабенко, Эльвира Расимовна Галиева, Елена Юрьевна Леберфарб</i> Компьютерные методы для анализа технологий секвенирования в анализе хромосомных контактов в клетке	171	<i>Светлана Андреевна Павлова, Анастасия Александровна Чулкова, Сергей Феликсович Дрозд, Людмила Григорьевна Захарова, Надежда Сергеевна Самойленкова, Александр Владимирович Ревизицин, Галина Валериевна Павлова</i> Изучение молекулярных маркеров мигрирующих клеток глиомы человека различной степени злокачественности	175
<i>Екатерина Вадимовна Орлова, Людмила Михайловна Смирнова, Ляйля Наилевна Каюмова, Полина Геннадьевна Свист</i> Опыт использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в лечении язв	171	<i>Софья Викторовна Павлова, Елена Васильевна Чепелева, Елена Вячеславовна Дементьева, Сурен Минасович Закиян</i> Перспективы использования кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в заместительной клеточной терапии повреждений миокарда	175
<i>Надежда Валерьевна Орлова, Александр Николаевич Муравьев, Татьяна Ивановна Виноградова, Наталья Михайловна Юдинцева, Юлия Александровна Нащекина, Александр Анатольевич Лебедев, Магомедсадик Гасанович Шейхов, Петр Казимирович Яблонский</i> Замещение дефекта мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных тканеинженерных продуктов	172	<i>Александра Витальевна Панова, Александра Никитична Богомазова, Мария Андреевна Лагарькова, Сергей Львович Киселёв</i> Инактивация X-хромосомы не коррелирует с метилированием гена AR в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека	176
<i>Полина Орлова, Мария Гридина, Алексей Кораблев, Олег Серов</i> Нормализация кариотипа ИПСК, полученных из фибробластов пациента с масштабной дупликацией дистального участка третьей хромосомы и недифференцированной умственной отсталостью	172	<i>Александра Витальевна Панова, Наталья Владимировна Клементьева, Анатолий Николаевич Тюльпаков, Сергей Львович Киселёв</i> Генетическая коррекция неонатального сахарного диабета для создания модели изучения заболевания	176
<i>Юлия Михайловна Орлова, Ирина Евгеньевна Трубицына</i> Влияние факторов BMP-2 и FGF-2 на пролиферацию и дифференцировку линии мышечных миобластов C2C12 в остеобласты	173	<i>Ина Георгиевна Панова, Юлия Вячеславовна Сухова, Александр Сергеевич Татиколов, Римма Алексеевна Полтавцева, Татьяна Юрьевна Иванец, Геннадий Тихонович Сухих</i> Содержание билирубина в стекловидном теле глаза человека в пренатальном развитии	177
<i>Егор Осидак, Павел Каралкин, Мария Осидак, Владислав Парфенов, Дмитрий Сивогринов, Фредерико Д.А.С. Перейра, Анна Грядунова, Елизавета Кудан, Юсеф Хесуани, Владимир Касьянов, Сергей Белоусов, Сергей Крашенинников, Тимофей Григорьев, Сергей Чвалун, Елена Буланова, Владимир Миронов, Сергей Домогатский</i> Коллаген Viscoll: биополимерный матрикс для создания биомедицинских клеточных продуктов и трехмерных тканеинженерных конструкций методом 3D печати	173	<i>Ина Георгиевна Панова, Мария Дмитриевна Чибирева, Римма Алексеевна Полтавцева</i> Катехоламины в тканях глаза в пренатальном развитии человека	177

<i>Н.М. Парамонова, Г.В. Гаврилов, Б.А. Парамонов, А.О. Шпаков</i> Возможный путь регенерации нервной ткани при идиопатической нормотензивной гидроцефалии	178	<i>Сергей Владимирович Пинчук, Ирина Борисовна Василевич, Александр Николаевич Красковский, Ксения Сергеевна Гилевская, Владимир Енокович Агабеков, Игорь Дмитриевич Волотовский</i> Функциональное состояние мезенхимных стволовых клеток жировой ткани при их взаимодействии с тонкоплёночными носителями на основе полисахаридов	182
<i>Дмитрий Николаевич Пеньков, Елена Викторовна Парфенова, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i> Гомеобокс-содержащие белки Prer1 и Meis в клеточных процессах	178	<i>Наталья Николаевна Пискунова, Евгений Евгеньевич Кудрявицкий, Евгений Дмитриевич Григорьевский, Елизавета Игоревна Сафронова, Сергей Сергеевич Дыдыкин, Степан Иванович Кольченко, Ольга Александровна Романова, Андрей Александрович Пантелеев, Елизавета Александровна Воробьева</i> Экспериментальная модель для лечения повреждений верхних дыхательных путей с использованием тканеинженерных материалов	182
<i>Николай Викторович Первушин, Даниил Романович Базанов, Виктория Юрьевна Савицкая, Лада Владимировна Аникина, Марина Валентиновна Проскурнина, Наталья Александровна Лозинская, Гелина Сергеевна Копеина</i> Исследование эффективности действия алкоксиарилпроизводных имидазолина в качестве потенциальных ингибиторов белок- белкового взаимодействия p53-МДМ2	179	<i>Галина Алексеевна Писугина, Ольга Игоревна Александрова, Юлия Игоревна Хорольская, Кирилл Эдуардович Журенков, Дарья Александровна Переплетчикова, Татьяна Вячеславовна Машель, Миральда Ивановна Блинова</i> Морфофункциональная характеристика лимбальных стволовых клеток кролика in vitro	183
<i>Ксения Игоревна Перепелина, Полина Евгеньевна Клаузен, Анна Александровна Костарева, Анна Борисовна Малашичева</i> Тканеспецифическое действие LMNA мутаций на сигнальный путь Notch в мезенхимных клетках человека в ходе остеогенной дифференцировки	179	<i>Анна Олеговна Пищелко, Михаил Васильевич Светлик, Николай Михайлович Немирович-Данченко, Марина Станиславовна Кудобаева, Татьяна Викторовна Ананьина, Яна Александровна Тюменцева, Анна Владимировна Наумова, Марина Юрьевна Ходанович</i> Применение вирусных векторов для изучения нейрогенеза у животных in vivo	183
<i>Марина Дмитриевна Перова, Владимир Борисович Карпюк, Ирина Валериевна Гилевич, Владимир Алексеевич Порханов, Игорь Александрович Севостьянов, Илья Игоревич Федоров</i> Регенеративный подход к максиллярной реконструкции челюстного гребня в свете дентальной имплантологии	180	<i>Егор Юрьевич Плотников, Денис Николаевич Силачев, Кирилл Владимирович Горюнов, Татьяна Игоревна Данилина, Любава Дмитриевна Зорова, Ирина Борисовна Певзнер, Геннадий Тихонович Сухих, Дмитрий Борисович Зоров</i> Изменения в функциях митохондрий, продукции АФК и терапевтической эффективности ММСК при старении	184
<i>Наталья Арнольдовна Петинати, Наталья Владимировна Сац, Нина Иосифовна Дризе, Николай Михайлович Капранов, Юлия Олеговна Давыдова, Екатерина Александровна Фастова, Аминат Умаросхабовна Магомедова, Сергей Кириллович Кравченко, Валерий Григорьевич Савченко</i> Влияние лимфоидной опухоли, не затраги- вающей костный мозг, на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки	180	<i>Ольга Владимировна Повещенко, Мария Александровна Суровцева, Александр Петрович Лыков, Ирина Иннокентьевна Ким, Наталья Анатольевна Бондаренко, Евгения Викторовна Янкайте, Александр Михайлович Чернявский, Алексей Вячеславович Фомичев</i> Эффект эритропоэтина на функциональную активность клеток костного мозга пациентов с ибс, которым проводилась трансмокардиальная лазерная реваскуляризация в сочетании с имплантацией прекондиционированных эритропоэтином клеток аутологичного костного мозга	184
<i>Наталья Валерьевна Петракова, Екатерина Алексеевна Кувшинова, Ирина Константиновна Свиридова, Ярослав Дмитриевич Шанский, Наталья Сергеевна Сергеева, Владимир Сергеевич Комлев, Сергей Миронович Баринов</i> Разработка системы бисфосфонат- октакальциевый фосфат для лечения опухолевых поражений костной ткани	181		
<i>Елена Сергеевна Петрова, Елена Николаевна Исаева, Елена Андреевна Колос, Дмитрий Эдуардович Коржевский</i> Распределение МСК в нервном стволе крысы-реципиента в ранние сроки после субперинеуральной аллотрансплантации в поврежденный седалищный нерв	181		

<i>Анна Григорьевна Полешко, Игорь Дмитриевич Волотовский</i> Молекулярно-генетические механизмы регуляции функциональной активности ММСК in vitro при физиологической гипоксии	184	<i>Анна Николаевна Попова, Ольга Сергеевна Роговая, Ксения Михайловна Дрыгина, Екатерина Андреевна Воротеляк</i> Влияние криоконсервации на адгезию и дифференцировку кератиноцитов в эпидермальном эквиваленте кожи	188
<i>Максим Олегович Политко, Анна Ивановна Прокаева, Александра Юрьевна Цидулко, Эльвира Витальевна Григорьева</i> Влияние комбинации золетила и домитора на ткань головного мозга экспериментальных животных в модельной системе in vivo	185	<i>Ольга Владимировна Попова</i> Этические аспекты применения технологии CRISPR/Cas9	189
<i>Римма Алексеевна Полтавцева, Денис Николаевич Силачев</i> Влияние аллогенных и ксеногенных мультипотентных мезенхимальных стромальных и нейральных стволовых и прогениторных клеток на восстановление неврологического дефицита у крыс после моделирования ишемического повреждения головного мозга	185	<i>Татьяна Николаевна Попырина, Любовь Андреевна Киляшова, Татьяна Владимировна Черненко, Christian Grandfils, Татьяна Сергеевна Демина</i> Регулирование структуры и морфологии биodeградируемых микрочастиц для регенеративной медицины	189
<i>Анна Сергеевна Пономарева, Людмила Анфилофьевна Кирсанова, Юлия Борисовна Басок, Игорь Александрович Милосердов, Виктор Иванович Севастьянов</i> Технология получения и морфофункциональный анализ тканеспецифического каркаса из фрагмента донорской поджелудочной железы	186	<i>Галина Ароновна Посыпанова, Мария Григорьевна Ратушняк, Юлия Павловна Семочкина, Елизавета Юрьевна Москалева</i> Сравнение чувствительности нейральных стволовых и (или) прогениторных клеток мыши к гамма- и нейтронному излучению	190
<i>Юлия Вячеславовна Пономарева, Наталья Николаевна Сарбаева, Марина Николаевна Милякова</i> Особенности тканевой реакции при имплантации ксеногенного высокоочищенного ацеллюлярного дермального матрикса	186	<i>Михаил Петрович Потапнёв</i> Развитие клеточных технологий лечения в Республике Беларусь	190
<i>Арина Игоревна Пономаренко, Игорь Викторович Манжуло</i> Синаптамид улучшает показатели когнитивной деятельности у крыс с черепно-мозговой травмой	187	<i>Евгений Валерьевич Пресняков, Оксана Владимировна Савва, Илья Ядигерович Бозо, Владимир Сергеевич Комлев, Роман Вадимович Деев</i> Особенности биоинтеграции генактивированного остеопластического материала на основе ОКФ	191
<i>Гурий Иванович Попов, Павел Васильевич Попрядухин, Галина Юрьевна Юкина, Валерий Николаевич Вавилова, Владимир Евгеньевич Юдин, Елена Михайловна Иванькова, Ирина Петровна Добровольская, Наталья Владимировна Смирнова</i> Роль мезенхимных стволовых клеток в формировании тканеинженерного сосудистого имплантата на основе биodeградируемой матрицы из поли(L-лактида)	187	<i>Евгения Алексеевна Примакова, Алла Александровна Сыманович, Екатерина Геннадьевна Петровская, Екатерина Александровна Назарова, Наталья Ивановна Дедюля, Евгения Сергеевна Бузук, Виктория Владимировна Смольникова, Виктория Юрьевна Гриневич, Наталья Феодосьевна Миланович, Светлана Ивановна Кривенко</i> Анализ влияния аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на субпопуляционный состав лимфоцитов реципиентов аллогенных гемопозитических стволовых клеток при их совместном культивировании in vitro	191
<i>Игорь Юрьевич Попов, Игорь Александрович Атманский, Иван Анатольевич Громов, Ильдар Наркисович Шарипов, Анна Александровна Быкова</i> Опыт лечения остеоартроза крупных суставов путем внутрисуставного введения эмульгированной аутологичной жировой ткани	188	<i>Валерий Иванович Путляев, Павел Владимирович Евдокимов, Алексей Викторович Гаршев, Елена Сергеевна Климашина, Татьяна Викторовна Сафронова, Ярослав Юрьевич Филиппов, Иван Михайлович Щербаков, Вадим Эрикович Дубров</i> Аддитивные технологии создания биоматериалов для регенерации костной ткани	192

<i>Анна Андреевна Расторгуева, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виталий Андреевич Брунчуков, Дарья Юрьевна Усупжанова, Ирина Владимировна Кобзева, Виктория Андреевна Никитина, Сергей Владимирович Лищук, Елена Александровна Дубова, Инна Михайловна Барабаш, Анастасия Евгеньевна Махова, Валентин Андреевич Брумберг, Татьяна Васильевна Карасёва, Екатерина Игоревна Добровольская, Елена Евгеньевна Ломоносова, Марина Александровна Таратоненкова, Татьяна Федоровна Маливанова, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов</i>	Оценка терапевтического потенциала кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток при химических ожогах у лабораторных животных 192
<i>Андрей Юрьевич Ратушный, Людмила Борисовна Буравкова</i>	Экспрессия кислород-зависимых генов в сенесцентных мезенхимальных стромальных клетках при тканевом уровне оксигенации 193
<i>Мария Григорьевна Ратушняк, Галина Ароновна Посыпанова, Юлия Павловна Семочкина, Ольга Владимировна Высоцкая, Александр Иванович Глухов, Елизавета Юрьевна Москалева</i>	Особенности репарации двунитевых разрывов ДНК в нейральных стволовых и (или) прогениторных клетках мыши после гамма-облучения 194
<i>Мария Сергеевна Ребенкова, Юлия Викторовна Роговская, Александра Энзевна Гомбожапова, Борис Ким, Вячеслав Валерьевич Рябов</i>	Макрофагальная инфильтрация в головном мозге и миокарде у пациентов с инфарктом миокарда I типа 194
<i>Дмитрий Александрович Решетников, Юлия Сергеевна Вершинина, Людмила Михайловна Межевикина</i>	Адгезия и пролиферативная активность мезенхимных стромальных клеток человека (МСКч) и первичных эмбриональных фибробластов мыши (ПЭФм) при культивировании на полиэлектролитных нанопленках 195
<i>Игорь Владимирович Ржепаковский, Александр Александрович Долгалев, Артур Ахматович Чагаров, Николай Николаевич Диденко</i>	Использование микроКТ для фенотипирования и анализа архитектуры костной ткани овец 195
<i>Светлана Алексеевна Родимова, Дарья Сергеевна Кузнецова, Николай Викторович Бобров, Дмитрий Георгиевич Реунов, Наталья Всеволодовна Вдовина, Владимир Евгеньевич Загайнов, Елена Владимировна Загайнова</i>	Метаболический имиджинг печени в процессе регенерации 196
<i>Алла Валерьевна Родина, Марина Юрьевна Копаева, Анастасия Николаевна Романцова, Валентина Георгиевна Шуватова, Елизавета Юрьевна Москалева</i>	Восстановление нейрогенеза после сочетанного действия общего γ -облучения в малой дозе и γ -облучения головы 196
<i>Сергей Александрович Родионов, Анна Александровна Грядунова, Валентина Клементьевна Ильина, Елена Владимировна Прохорова, Алексей Вадимович Волков, Михаил Михайлович Сморгчов, Николай Васильевич Загородний, Владимир Александрович Миронов, Алексей Вячеславович Ковалев</i>	Регенерация хряща в органной культуре с помощью тканевых сфероидов, сформированных из клеток надхрящницы ребра 197
<i>Владимир Викторович Розанов, Анна Александровна Николаева, Игорь Васильевич Матвейчук, Александр Петрович Черняев</i>	Инновационная технология радиационной стерилизации костных имплантатов с низкой дозой поглощения 197
<i>Юрий Алексеевич Рочев</i>	Биоматериалы, процессы и поля в технологиях биофабрикаций 198
<i>Ксения Рубина, Екатерина Семина, Вероника Сысоева, Всеволод Ткачук, Карина Рысенкова, Полина Климович, Анна Шмакова</i>	Навигационные рецепторы в процессах роста сосудов и нервов и опухолевой прогрессии 198
<i>Юрий Петрович Рубцов, Марат Самвелович Павлюков, Эдуард Константинович Писарев, Татьяна Олеговна Абакумова</i>	Роль длинных некодирующих РНК в дифференцировке и поддержании плюрипотентности стволовых клеток глиом ... 199
<i>Станислав Александрович Рыбцов, Татьяна Николаевна Березина</i>	Мониторинг онтогенеза кроветворения и подходы к оценке его развития и возрастных изменений 199
<i>Карина Дмитриевна Рысенкова, Ксения Андреевна Рубина, Карина Александровна Иванова, Максим Николаевич Карагяур, Екатерина Владимировна Семина</i>	Роль урокиназной системы в канцерогенезе и метастазировании опухолевых клеток с участием микроРНК 200
<i>Андрей Александрович Рябинин, Екатерина Павловна Калабушева, Элина Сергеевна Чермных, Екатерина Андреевна Воротеляк</i>	Разработка технологий для получения аутологичных кожных эквивалентов и волосяных фолликулов с использованием ИПСК человека 200

<i>Владимир Михайлович Рябов, Ольга Владимировна Жидкова, Борис Валентинович Попов</i> Новая популяция мезенхимных стволовых клеток из сердца плодов мышей GFP для моделирования регенерации сердца 201	<i>Диана Ирековна Салихова, Георгий Евгеньевич Леонов, Татьяна Борисовна Бухарова, Наталья Вадимовна Булатенко, Олег Владимирович Махнач, Андрей Витальевич Макаров, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов, Дмитрий Вадимович Гольдштейн</i> Сравнительный анализ способности различных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток дифференцироваться в нейральном направлении 204
<i>Сергей Иванович Рябов, Владимир Александрович Смирнов, Марина Александровна Звягинцева, Михаил Яковлевич Ядгаров, Сергей Александрович Базанович, Владимир Николаевич Смирнов</i> Применение криоконсервированных клеток пуповинной крови человека при моделировании спинальной травмы у крыс 201	<i>Игорь Валерьевич Саматошенков, Маргарита Николаевна Журавлева, Юрий Александрович Челышев</i> Генная терапия хронической ишемии задних конечностей у крыс 205
<i>Ирина Николаевна Сабурин</i> Новые клеточные технологии управления репаративным морфогенезом 202	<i>Наталья Борисовна Сапунова, Алена Олеговна Богатырева, Надежда Викторовна Ревина, Елена Владимировна Лияськина, Виктор Васильевич Ревин</i> Биоматериалы на основе бактериальной целлюлозы для регенеративной медицины 205
<i>Валерий Григорьевич Савченко</i> Профилактика и лечение реакции трансплантат против хозяина с помощью клеточной терапии 202	<i>Марина Владиславовна Сарычева, Полина Александровна Голубинская, Сергей Викторович Надеждин, Юрий Евгеньевич Бурда</i> Купирование <i>imi</i> quimod-индуцированного псориаза у крыс секретомом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток 206
<i>Ирина Петровна Савченкова, Екатерина Александровна Савченкова, Юлия Алексеевна Осипова</i> Получение из эмбриональных стволовых клеток мыши клеток с фенотипом подобным моноцитам и макрофагам 202	<i>Татьяна Викторовна Сафронова, Андрей Сергеевич Киселев, Татьяна Борисовна Шаталова, Ярослав Юрьевич Филиппов, Владимир Валентинович Зайцев, Ирина Ивановна Селезнева</i> Биосовместимость керамических материалов на основе пирофосфата кальция 206
<i>Георгий Дмитриевич Сагарадзе, Наталья Андреевна Басалова, Владимир Игоревич Кирпатовский, Дмитрий Александрович Охоботов, Петр Петрович Нимирицкий, Ольга Александровна Григорьева, Владимир Сергеевич Попов, Армаис Альбертович Камалов, Всеволод Арсеньевич Ткачук, Анастасия Юрьевна Ефименко</i> Мезенхимные стромальные клетки как потенциальные координаторы восстановления ниши стволовой клетки 203	<i>Татьяна Викторовна Сафронова, Отабек Улугбекович Тошев, Татьяна Борисовна Шаталова, Юлия Сергеевна Лукина, Константин Викторович Малютин, Ярослав Юрьевич Филиппов, Владимир Валентинович Зайцев, Ирина Ивановна Селезнева, Валентина Константиновна Крутько, Ольга Николаевна Мусская</i> Биосовместимые кальцийфосфатные керамические материалы, полученные обжигом цементного камня 207
<i>Дмитрий Игоревич Сажнев, Александр Алексеевич Андреев, Александр Анатольевич Глухов</i> Потенцирование регенерации у больных с абсцессами печени методом фотодинамической терапии 203	<i>Алексей Владимирович Сачков, Наталья Валерьевна Боровкова, Никита Евгеньевич Пидченко, Александр Сергеевич Миронов, Тамара Георгиевна Спиридонова, Елена Александровна Жиркова, Кирилл Всеволодович Светлов, Михаил Анатольевич Мигунов, Александр Олегович Медведев</i> Применение повязок на основе лиофилизированного человеческого коллагена I типа для лечения донорских ран в комбустиологии 207
<i>Сергей Владимирович Сазонов, Александр Александрович Бриллиант, Сергей Михайлович Демидов</i> Опухолевые стволовые клетки в карциноме молочной железы 204	

<i>Галина Викторовна Селедцова, Ирина Петровна Иванова, Юрий Анатольевич Кожевников, Сергей Николаевич Белогородцев</i>	
Использование аутологичных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в лечении больных хроническим остеомиелитом длинных костей	208
<i>Наталья Юрьевна Семенова, Виктор Иванович Ругаль, Анна Вадимовна Чубарь, Натэлла Иосифовна Енукашвили, Сергей Васильевич Грицаев, Иван Иванович Кострома, Анастасия Андреевна Жернякова, Станислав Семенович Бессмельцев</i>	
Характеристика мезенхимных стромальных клеток костного мозга пациентов с множественной миеломой	208
<i>Екатерина Владимировна Семина, Полина Сергеевна Климович, Ксения Андреевна Рубина, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i>	
3D-эксплантная культура спинального ганглия мышцы как модель для исследований нейротрофинов в регенеративной медицине ...	209
<i>Екатерина Владимировна Семина, Ксения Андреевна Рубина, Карина Дмитриевна Рысенкова, Полина Сергеевна Климович, Максим Николаевич Карагяур, Всеволод Арсеньевич Ткачук</i>	
Молекулярные механизмы участия урокиназной системы в направленном росте аксонов, дифференцировке и выживаемости нейронов и регенерации нервов	209
<i>Олеся Олеговна Сербина, Екатерина Владимировна Киселева, Егор Сергеевич Васецкий</i>	
МСК способствуют профибротическим изменениям мышечной ткани при ЛЛПМД	210
<i>Валерий Георгиевич Сергеев, Виктор Михайлович Чучков, Татьяна Николаевна Сергеева</i>	
Дозазависимое влияние нейровоспаления на пролиферативную и миграционную активность нейральных стволовых клеток субвентрикулярной зоны мозга крыс	210
<i>Наталья Сергеевна Сергеева, Валентина Александровна Кирсанова, Юсеф Джорджевич Хесуани, Павел Анатольевич Каралкин, Ирина Константиновна Свиридова</i>	
На этапах разработки технологии формирования конструкторов щитовидной железы человека	211
<i>Ольга Владимировна Сергеева, Рената Салаватовна Ялчина, Татьяна Олеговна Абакумова, Татьяна Александровна Приказчикова, Илья Игоревич Курочкин, Тимофей Сергеевич Зацепин</i>	
Сравнительный анализ экспрессии генов при ингибировании РНК хеликазы DDX3 in vitro и in vivo	211
<i>Иван Алексеевич Сидоренко, Владимир Николаевич Бабенко</i>	
Анализ экспрессии некодирующей РНК Malat1, связанной с нейрогенезом, в пяти отделах мозга мышей в модели стресса выявила значимые изменения в гипоталамусе	212
<i>Любовь Сергеевна Сидорович, Наталья Аркадьевна Михайлова, Михаил Георгиевич Хотин</i>	
Опыт внедрения программы микробиологического мониторинга при производстве биомедицинских клеточных продуктов	212
<i>Денис Николаевич Силачев, Кирилл Владимирович Горюнов, Маргарита Александровна Шпилюк, Ольга Сергеевна Безнощенко, Наталия Яковлена Морозова, Елизавета Евгеньевна Краевая, Василий Андреевич Попков, Ирина Борисовна Певзнер, Любава Дмитриевна Зорова, Екатерина Алексеевна Евтушенко, Наталия Леонидовна Стародубцева, Алексей Сергеевич Кононихин, Анна Евгеньевна Бугрова, Евгений Геннадиевич Евтушенко, Егор Юрьевич Плотников, Дмитрий Борисович Зоров, Геннадий Тихонович Сухих</i>	
Влияние МСК и внеклеточных везикул, полученных из МСК, на коагуляционный гемостаз	212
<i>Татьяна Юрьевна Сеницына, Марина Николаевна Парасковей, Арюна Пурбодоржиевна Цыбденова, Юрий Содномович Балханов, Олег Сергеевич Очиров, Эрдэм Баирович Дашинамаев</i>	
Оценка безопасности и эффективности децеллюляризованных коллаген-ламининовых матриц, содержащих полигуанидин, при восстановлении раневых дефектов	213
<i>Сергей Владимирович Сирак, Евгений Вячеславович Щетинин, Николай Николаевич Диденко, Алла Григорьевна Сирак, Мария Олеговна Диденко</i>	
Способ создания экспериментальной модели остеопороза	213
<i>Дарья Александровна Сичкар, Александра Дугаровна Балданшириева, Юлия Владимировна Бабушкина, Олег Германович Макеев</i>	
3D биоэквивалент кожи на основе среднемолекулярных пептидов и живых клеток ...	214
<i>Елена Вячеславовна Скворцова, Сергей Анатольевич Синенко, Валерий Всеволодович Зенин, Алексей Николаевич Томилин</i>	
Получение регуляторных дендритных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши для их использования в моделях трансплантации тканей	214
<i>Виктория Валерьевна Скопенкова, Вадим Евгеньевич Жерновков, Анна Вячеславовна Старикова, Татьяна Владимировна Егорова</i>	
Создание нового синтетического мышечно-специфического промотора	215

<i>Владимир Александрович Смирнов, Андрей Анатольевич Гринь, Сергей Иванович Рябов, Марина Александровна Звягинцева, Владимир Николаевич Смирнов</i> Системное применение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека при контузионной травме спинного мозга тяжелой степени (ASIA A/B): I/IIa стадии рандомизированного неослепленного проспективно-ретроспективного клинического исследования безопасности и эффективности ..	215	<i>Александр Александрович Стадников, Геннадий Михайлович Кавалерский, Сергей Васильевич Архипов, Максим Анатольевич Макаров</i> Новые методы хондропластики коленного сустава с использованием регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток	219
<i>Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Юрий Валерьевич Зобков, Владимир Сергеевич Комлев</i> Влияние магнитных полей на кристаллизацию дикальцийфосфата дигидрата и октакальцийфосфата	216	<i>Татьяна Юрьевна Старкова, Антон Владимирович Беляев, Сергей Вячеславович Пономарцев, Алексей Николаевич Томилин</i> Негистоновые белки HmgB1 и HmgB2 в хроматине эмбриональных стволовых клеток мыши	220
<i>Светлана Николаевна Смирнова, Анна Александровна Жукова, Елизавета Сергеевна Агеева, Екатерина Владимировна Лайкова, Владимир Владимирович Оберемок</i> Оценка влияния антисмыслового тифосфатного 5.8SrRNA-1 1-фрагмента на рост клеточной линии карциномы человека HEp-2	216	<i>Ирина Георгиевна Старостина, Дарья Сергеевна Чулпанова, Алиса Алмазовна Шаймарданова, Валерия Владимировна Соловьева, Иван Антонович Яковлев, Роман Вадимович Деев, Артур Александрович Исаев, Альберт Анатольевич Ризванов</i> MuoD-индуцированная трансдифференцировка дермальных фибробластов с мутацией в гене DYSF, рассматриваемая как тест-система для скрининга препаратов дисферлинопатии	220
<i>Иван Александрович Смышляев, Сергей Ильсверович Гильфанов, Илья Игоревич Еремин, Андрей Алексеевич Пулин, Ильмира Ренатовна Гильмутдинова</i> Возможности лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний коленного сустава при помощи стромально-васкулярной фракции из жировой ткани	217	<i>Ирина Георгиевна Старостина, Алиса Алмазовна Шаймарданова, Диана Рустамовна Аглиуллина, Валерия Владимировна Соловьева, Иван Антонович Яковлев, Артур Александрович Исаев, Роман Вадимович Деев, Альберт Анатольевич Ризванов</i> Модификация клеток HEK293A с использованием технологии CRISPR-Cas9 SAM для транскрипционной активации гена дисферлина	221
<i>Мария Георгиевна Соколова, Екатерина Валентиновна Лопатина</i> Изучение влияния РГПУ 260 на рост нейритов в органотипической культуре нервной ткани в присутствии сыворотки крови больных спинальной мышечной атрофии 2 типа	217	<i>Юрий Сергеевич Стафеев, Светлана Сергеевна Мичурина, Никита Владимирович Подкуйченко, Игорь Александрович Складник, Екатерина Алексеевна Шестакова, Камиль Абусаидович Яхьяев, Анатолий Владимирович Юрасов, Александр Вячеславович Воротников, Михаил Юрьевич Меньшиков, Марина Владимировна Шестакова, Елена Викторовна Парфенова</i> Сравнительное исследование бежевой дифференцировки мезенхимных стромальных клеток жировой ткани пациентов с морбидным ожирением и наличием/отсутствием сахарного диабета 2 типа	221
<i>Анастасия Соловьева, Александра Светлана</i> Сравнительный анализ диаметров мезенхимных стволовых клеток костного мозга кролика на разных пассажах культивирования	218	<i>Ольга Владиславовна Степанова, Анастасия Денисовна Воронова, Андрей Викторович Чадин, Марат Петрович Валихов, Алевтина Сергеевна Семкина, Игорь Владимирович Решетов, Владимир Павлович Чехонин</i> Эффективность трансплантации обкладочных клеток обонятельной выстилки человека и крыс при хронических повреждениях спинного мозга	222
<i>Анастасия Соловьева, Светлана Михайловна Мирошниченко, Антон Михайлович Манахов</i> Модификация нановолокон поликапролактона для широкого спектра задач регенеративной медицины	218		
<i>Александр Сергеевич Сотниченко, Ирина Валерьевна Гилевич, Карина Игоревна Мелконян, Яна Андреевна Юцкевич, Антон Владимирович Каракулев, Сергей Борисович Богданов, Илья Михайлович Быков, Владимир Алексеевич Порханов, Андрей Николаевич Редько, Сергей Николаевич Алексеенко</i> Разработка новой методики получения дермального внеклеточного матрикса	219		

<i>Анастасия Юрьевна Столбовая, Илья Валерьевич Смирнов, Агния Александровна Пиневиц, Наталья Леоновна Вартанян, Дарья Сергеевна Семенова, Анна Борисовна Малашичева, Марина Платоновна Самойлович</i> Моноклональные антитела к эндоглину человека вызывают изменения функциональных свойств клеток эндотелия EA.hy926 и HUVEC	222	<i>Елена Александровна Супруненко, Елизавета Алексеевна Сазонова, Александр Михайлович Куринов, Евгений Геннадиевич Евтушенко</i> К характеристике внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток человека ..	226
<i>Мария Алексеевна Стрельцова, Софья Алексеевна Ерохина, Полина Андреевна Кобызева, Анна Александровна Бойко, Елена Ивановна Коваленко</i> Клоны НК-клеток с фенотипом CD57 ⁺ NKG2C ⁺ обладают лучшей жизнеспособностью, по сравнению с клонами, полученными из субпопуляции CD57 ⁺ NKG2C ⁺	223	<i>Елизавета Рафаэлевна Сурина, Жанна Алексеевна Акоюн, Ляля Адыгамовна Габбасова</i> Актуальные вопросы гармонизации и развития терминов, применяемых в области биомедицины	227
<i>Мария Алексеевна Стрельцова, Софья Алексеевна Ерохина, Полина Андреевна Кобызева, Леонид Михайлович Каневский, Мария Владимировна Гречихина, Елена Ивановна Коваленко</i> Фенотипическая характеристика клональных культур, полученных из субпопуляции НК-клеток CD57 ⁺ NKG2C ⁺	223	<i>Мария Александровна Суровцева, Игорь Алексеевич Искаков, Ольга Владимировна Повещенко, Александр Петрович Лыков, Ирина Иннокентьевна Ким, Евгения Викторовна Янкайте, Наталья Анатольевна Бондаренко, Наталья Петровна Бгатова, Александр Николаевич Трунов, Валерий Вячеславович Черных</i> Характеристика стволовых клеток лимба человека в зависимости от метода выделения и условий культивирования	227
<i>Мария Евгеньевна Стуканёва, Евгения Владиславовна Пуцина, Дмитрий Константинович Обухов</i> Репаративный нейрогенез в мозжечке молодых симы <i>Onchorhynchus masou</i> после механического повреждения	224	<i>Юрий Владимирович Суханов, Павел Михайлович Соколов, Игорь Михайлович Абашин</i> Стратегические и тактические вопросы разработки, производства, маркетинга и применения биомедицинских клеточных продуктов в России	228
<i>Алена Сергеевна Ступникова, Ирина Сергеевна Захарова, Александр Игоревич Шевченко, Сурен Минасович Закиян</i> Разработка подходов к применению митотически инактивированных васкулярных клеток в регенеративной медицине	224	<i>Татьяна Владимировна Сухачева, Наталья Викторовна Низяева, Мария Викторовна Самсонова, Андрей Львович Черняев, Александр Иванович Щеголев, Роман Андреевич Серов</i> Телоциты — интерстициальные стволовые клетки мезенхимального происхождения	228
<i>Анастасия Михайловна Суббот, Иван Александрович Новиков, Олег Александрович Гусев, Наталья Евгеньевна Гоголева, Елена Ильясовна Шагмарданова, Сабина Александровна Кондратьева</i> Влияние хлорида неодиима на культуры клеток в условиях отсутствия свободных фосфатов ...	225	<i>Кирилл Константинович Сухинич, Эрдэм Баирович Дашинимаев, Екатерина Андреевна Воротеляк, Мария Анатольевна Александрова</i> Клетки неокортекса, помещенные в желатиновый гидрогелевый кондуит, стимулируют восстановление периферического нерва	229
<i>Анастасия Михайловна Суббот, Николай Михайлович Югай, Юрий Михайлович Ефремов, Петр Сергеевич Тимашев, Иван Александрович Новиков</i> Изучение клеточных пластов в условиях нарушенного минерального баланса для моделирования патогенеза кератоконуса и других заболеваний роговицы	225	<i>Лейсан Газинуровна Тазетдинова, Светлана Сергеевна Архипова, Светлана Анатольевна Софронова, Айсылу Илдаровна Муллагулова, Михаил Олегович Мавликеев, Валерия Владимировна Соловьева, Альберт Анатольевич Ризванов</i> Создание ксенорафтной модели нейробластомы человека на иммунокомпетентных мышцах	229
<i>Анастасия Михайловна Суббот, Наталья Владимировна Фисенко</i> Изучение биосовместимости с клетками лимба роговицы человека матриц на основе коллагена, применяющихся в антиглаукомной хирургии	226	<i>Андрей Александрович Темнов, Станислав Анатольевич Бирюков, Глеб Игоревич Фильков, Ангелина Владимировна Потапова, Александр Валерьевич Лисин, Елена Владимировна Горина, Валерий Владимирович Бояринцев, Александр Викторович Трофименко</i> Разработка технологии создания биомедицинского клеточного продукта для лечения обморожений, ожогов и ранений в условиях арктики	230

<i>Тимур Хасянович Тенчурич, Алексей Дмитриевич Шепелев, Елена Вячеславовна Сытина, Елена Викторовна Истранова, Виссарион Георгиевич Мамагулашвили, Сергей Владимирович Крашенинников, Роман Андреевич Камышинский, Елизавета Васильевна Нестеренко, Сергей Николаевич Чвалун</i> Исследование структуры, механических и биологических свойств нановолокнистых материалов на основе коллагена	230	<i>Снежана Алексеевна Тихонова, Валерий Иванович Путляев, Павел Владимирович Евдокимов, Татьяна Викторовна Сафронова, Андрей Александрович Тихонов, Николай Константинович Орлов, Алексей Викторович Гаршев, Елена Сергеевна Климашина, Ярослав Юрьевич Филиппов, Иван Михайлович Щербаков, Вадим Эрикович Дубров</i> Магнитоэлектрические композитные материалы для регенерации костной ткани	234
<i>Полина Олеговна Теплова, Анатолий Сергеевич Сенотов, Ирина Сергеевна Фадеева, Алёна Игоревна Звягина, Владислав Валентинович Минайчев, Анастасия Юрьевна Тетерина, Владимир Семёнович Акатов</i> Исследование остеоиндуктивного эффекта сочетания рост-факторов BMP-2, PDGF и VEGF в материале на основе деминерализованного костного матрикса	231	<i>Алексей Николаевич Томилин</i> Молекулярные механизмы регуляции клеточной плюрипотентности	234
<i>Валерий Павлович Терещенко, Юлия Николаевна Хантакова, Василий Васильевич Курилин, Александр Николаевич Силков, Юлия Александровна Шевченко, Юлия Анатольевна Лопатникова, Амир Закиевич Максюттов, Сергей Витальевич Сенников</i> Индукция регуляторных Т-клеток с помощью дендритных клеток, трансфицированных IL-10 ...	231	<i>Екатерина Максимовна Трифанова, Роман Александрович Акасов, Алла Николаевна Генералова, Александра Олеговна Мариянац, Александр Георгиевич Савельев, Анастасия Владимировна Сочилина, Евгений Валерьевич Хайдуков, Владимир Карлович Попов</i> Электроспиннинг и структурная стабилизация коллагеновых матриксов для тканеинженерных конструкций	235
<i>Харламбий Пантелеевич Тирас, Александр Николаевич Яворский, Александр Александрович Деев, Светлана Евгеньевна Нефедова</i> Цифровая морфометрия регенерации планарий — как модель исследования действия слабых химических и физических факторов на процесс регенерации in vivo	232	<i>Ирина Евгеньевна Трубицына, Заира Магомедовна Абдулатипова, Юлия Михайловна Орлова, Галина Григорьевна Варванина</i> Дезорганизация ритмики процессов регенерации	235
<i>Ольга Павловна Тихобразова, Мария Сергеевна Муравева, Евгений Александрович Ключев, Ольга Сергеевна Баскина, Ирина Васильевна Мухина</i> Применение 3D биodeградируемого скаффолда на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты при реконструктивной терапии тяжелой ЧМТ	232	<i>Ирина Сергеевна Трухан, Наталья Николаевна Дремина, Михаил Геннадьевич Шурыгин, Ирина Александровна Шурыгина</i> Влияние блокады р38 MAPK на окислительное фосфорилирование в культуре фибробластов	236
<i>Андрей Александрович Тихонов, Елена Сергеевна Климашина, Павел Владимирович Евдокимов, Валерий Иванович Путляев, Георгий Александрович Шипунов, Иван Михайлович Щербаков, Вадим Эрикович Дубров, Наталья Владимировна Данилова, Павел Георгиевич Мальков</i> Упругие гидрогелевые биоматериалы со сложной архитектурой для регенерации костной ткани	233	<i>Виктор Васильевич Турчин, Максим Витальевич Солопов, Дмитрий Васильевич Жихарев, Андрей Геннадиевич Попандопуло, Валерий Викторович Бурховецкий, Валентина Александровна Глазунова, Эмиль Яковлевич Фисталь, Михаил Сергеевич Кондрусь, Андрей Леонидович Боряк</i> Адгезия и жизнеспособность фетальных фибробластов человека, культивируемых на 3D-печатном матриксе из поликапролактона	236
<i>Снежана Алексеевна Тихонова, Павел Владимирович Евдокимов, Екатерина Сергеевна Новоселецкая, Анастасия Юрьевна Ефименко, Валерий Иванович Путляев</i> Ультрапористые керамические биорезорбируемые материалы со сложной архитектурой для регенерации костной ткани	233	<i>Ольга Владимировна Тюмина, Станислав Евгеньевич Волчков, Павел Анатольевич Овчинников</i> Применение гематопозитических стволовых клеток пуповинной крови	236
		<i>Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Анастасия Михайловна Иванова, Вадим Игоревич Чечехин, Александр Владимирович Балацкий, Вероника Юрьевна Сысоева, Полина Максимчик, Наталия Игоревна Калинина</i> Гетерологическая сенситизация α -1A-адренорецепторов как механизм выбора дифференцировочной судьбы мезенхимных стромальных клеток	237

<i>Елизавета Ивановна Устьянцева, Сергей Петрович Медведев, Сурен Миначович Закиян</i> Создание клеточной платформы для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически-кодируемых биосенсоров	237	<i>Галина Васильевна Федотовских, Манарбек Бапович Аскарар, Дана Талаповна Сайпиева</i> Эффективность клеточной терапии язвенного колита с позиций регенераторного воздействия на нишу стволовой клетки слизистой оболочки толстой кишки	241
<i>Дарья Юрьевна Усупжанова, Татьяна Алексеевна Астрелина, Виктория Андреевна Никитина, Юлия Борисовна Сучкова, Ирина Владимировна Кобзева, Виталий Андреевич Брунчуков, Анна Андреевна Расторгуева, Валентин Андреевич Брумберг, Андрей Юрьевич Бушманов, Александр Сергеевич Самойлов</i> Влияние низких доз рентгеновского излучения на жизнедеятельность мезенхимальных стволовых клеток человека	238	<i>Александр Владимирович Федуров, Мария Сергеевна Котлярова, Анна Сергеевна Солдатенко, Анастасия Михайловна Мойсенович, Дмитрий Юрьевич Семенов, Иван Викторович Бессонов, Александр Владимирович Куликов, Анастасия Юрьевна Архипова, Михаил Михайлович Мойсенович</i> Восстановление стенки кишечника крысы в модели циркулярного дефекта с применением фиброин-содержащего скаффолда	241
<i>Федор Алексеевич Фадеев, Юлия Ярославовна Хрунык, Сергей Владимирович Беликов, Даяна Владимировна Луговец, Оксана Владимировна Губаева, Сергей Леопольдович Леонтьев, Сергей Владимирович Сазонов, Артемий Александрович Попов</i> Оценка влияния структурированной диоксидной пленки на формирование фибробластами фиброзной капсулы при имплантации материала	238	<i>Анна Степановна Фефилова, Ольга Владимировна Сергеева, Павел Мазин, Игорь Игоревич Киреев, Тимофей Сергеевич Зацепин</i> Длинная некодирующая РНК MORRBID связана с процессингом пре-мРНК в гепатоцитах	242
<i>Инна Вилоровна Фадеева, Татьяна Викторовна Сафронова, Александр Сергеевич Фомин, Ольга Станиславовна Антонова, Ирина Ивановна Селезнева</i> Кальцийфосфатная керамика из синтетических порошков для биомедицинских применений	239	<i>Анна Филимонова, Евстратова Екатерина, Петр Шегай, Юлия Елисеева</i> Проблемы и перспективы создания материалов для 3D биопечати	242
<i>Инна Вилоровна Фадеева, Александр Сергеевич Фомин, Сергей Миронович Баринов, Галина Анатольевна Давыдова, Ирина Ивановна Селезнева, Марат Ревгеревич Гафуров, Фадис Фанилович Мурзаханов, Абдульрахман Исмаил Ахмед, Георгий Владимирович Мамин</i> Композиционные материалы из гидроксипатита и поливинилпирролидона для медицины	239	<i>Иван Юрьевич Филин, Кристина Викторовна Китаева, Дарья Сергеевна Чулпанова, Альберт Анатольевич Ризванов, Валерия Владимировна Соловьева</i> Анализ взаимодействия внеклеточных везикул клеток карциномы толстой кишки с Т-лимфоцитами человека in vitro	243
<i>Алексей Леонидович Файзуллин, Семен Николаевич Чурбанов, Алина Юрьевна Капитанникова, Марк Валерьевич Токарев, Даниил Леонидович Мудряк, Яна Игоревна Христидис, Анна Евгеньевна Гуллер, Александр Витальевич Курков, Александра Валерьевна Бутенко, Петр Сергеевич Тимашев, Анатолий Борисович Шехтер</i> Локальная доставка пирфенидона для контроля перимплантного фиброза: эксперимент in vivo	240	<i>Иван Борисович Филиппенков, Василий Васильевич Ставчанский, Алина Евгеньевна Денисова, Леонид Васильевич Губский, Николай Федорович Мясоедов, Светлана Андреевна Лимборская, Людмила Васильевна Дергунова</i> Сравнительный транскриптомный анализ микроРНК и их мРНК-мишеней в мозге крыс под действием нейропептида семакс в условиях экспериментальной ишемии	243
<i>Александр Юрьевич Федотов, Артем Александрович Котьяков, Игорь Валерьевич Смирнов, Олег Витальевич Баранов, Сергей Миронович Баринов, Владимир Сергеевич Комлев</i> Покрyтия на основе октакальций фосфата для костных имплантатов	240	<i>Иван Викторович Фраучи, Фарид Вагизович Баширов, Сергей Александрович Обыденнов, Кирилл Андреевич Жаббаров, Леонид Алексеевич Новиченков, Эмиль Ильнурович Бариев, Дарья Алексеевна Назарова, Гареева Регина Рустэмовна, Михаил Самуилович Левин</i> Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы на лабораторных животных ...	244
		<i>Иван Викторович Фраучи, Сергей Александрович Обыденнов, Фарид Вагизович Баширов, Ильфат Фаридович Галяутдинов, Дарья Алексеевна Назарова, Эмиль Ильнурович Бариев, Леонид Алексеевич Новиченков, Кирилл Андреевич Жаббаров, Гареева Регина Рустэмовна, Михаил Самуилович Левин</i> Использование крупных лабораторных животных для моделирования инсульта	244

<i>Иван Викторович Фраучи, Фарид Вагизович Баширов, Сергей Александрович Обыденнов, Ильфат Фаридович Галаятдинов, Кирилл Андреевич Жаббаров, Эмиль Ильнурович Бариев, Леонид Алексеевич Новиченков, Гареева Регина Рустэмовна, Дарья Алексеевна Назарова</i>	
Экспериментальное моделирование регенерации слизистой оболочки при перемещенном в желудок демукострованном трансплантате	245
<i>Татьяна Семеновна Хабалова, Ирина Петровна Иванова, Эрика Александровна Кащенко</i>	
Иммунный ответ лабораторных животных (СВФ мышей) на бактериофаг семейства Podoviridae при различных типах его введения	245
<i>Татьяна Семеновна Хабалова, Эрика Александровна Кащенко, Галина Викторовна Селедцова</i>	
Сравнительная характеристика содержания Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток при трансплантации мезенхимальных стромальных клеток и полученных из них внеклеточных везикул в модели почечной недостаточности мышей	246
<i>Александр Викторович Халявкин</i>	
Старение тканеспецифичных стволовых клеток in situ — причины, механизмы, следствия	246
<i>Александр Викторович Халявкин</i>	
Один из возможных механизмов формирования асимметричных делений стволовых клеток на примере образования вертикальных делений полустволовых базальных клеток интерфолликулярного эпидермиса	246
<i>Светлана Анатольевна Хмелевская</i>	
Регенеративная медицина и ситуации «последней надежды»: моральные и правовые проблемы	247
<i>Ирина Викторовна Холоденко, Роман Васильевич Холоденко, Леонид Константинович Курбатов, Гарик Ваганович Манукьян, Константин Никитич Ярыгин</i>	
Сравнительный транскриптомный анализ иммунных маркеров, экспрессируемых в мезенхимных стволовых клетках, выделенных из печени пациентов с циррозом и фиброзом	247
<i>Юлия Игоревна Хорольская, Ольга Игоревна Александрова, Галина Алексеевна Писугина, Кирилл Эдуардович Журенков, Дарья Александровна Переплетчикова, Татьяна Вячеславовна Машель, Наталья Аркадьевна Михайлова, Миральда Ивановна Блинова</i>	
Лимбальные стволовые клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, как компонент тканеинженерной конструкции роговицы	248
<i>Елена Александровна Храмцова, Егор Степанович Мороков, Тимофей Евгеньевич Григорьев, Вадим Моисеевич Левин</i>	
Методы неинвазивной ультразвуковой визуализации высокого разрешения для оценки качества получаемых матриц и анализа процессов их биоразложения	248
<i>Наталья Игоревна Храмцова, Сергей Александрович Плаксин, Артем Юрьевич Соцков</i>	
Жизнеспособность адипоцитов и фибробластоподобных клеток в различных видах липоаспирата	249
<i>Наталья Игоревна Храмцова, Сергей Александрович Плаксин, Артем Юрьевич Соцков</i>	
Морфометрия адипоцитов, полученных из различных анатомических зон	249
<i>Наталья Игоревна Храмцова, Артем Юрьевич Соцков, Сергей Александрович Плаксин, Наталия Ивановна Гуляева</i>	
Характеристика повреждения клеток при фильтрации липоаспирата	250
<i>Александр Александрович Худяков, Анастасия Константиновна Зайцева, Ксения Игоревна Перепелина, Константин Олегович Гусев, Полина Евгеньевна Клаузен, Алексей Валерьевич Карпушев, Алексей Николаевич Томилин, Анна Борисовна Малашичева, Анна Александровна Костарева</i>	
Изучение молекулярных механизмов аритмогенной кардиомиопатии на модели иПСК-кардиомиоцитов: фокус на GSK3B киназу	250
<i>Зоя Ивановна Цоколаева, Константин Владимирович Дергилев, Мария Александровна Болдырева, Анастасия Валерьевна Комова, Елена Викторовна Парфенова</i>	
Разработка метода визуализации прогениторных клеток эпикарда после инфаркта	251
<i>Александр Андреевич Чапленко</i>	
Разработка и валидация комбинированной методики детекции микоплазм в человеческих клеточных линиях	251
<i>Сергей Валерьевич Чеботарёв, Владимир Васильевич Хоминец, Лидия Ивановна Калюжная, Алексей Сергеевич Гранкин, Артем Владимирович Барабанов</i>	
Использование гидрогеля из биоматериала пуповины человека для восстановления поврежденных суставного хряща	252
<i>Борис Павлович Челобанов, Вера Сергеевна Черноносорова, Алена Олеговна Степанова, Мария Васильевна Харьковская, Андрей Анатольевич Карпенко, Павел Петрович Лактионов</i>	
Цитотоксичность сиролимуса, паклитакселя и диклофенака против первичных и трансформированных клеток	252

- Элина Сергеевна Черных, Екатерина Павловна Калабушева, Егор Олегович Осидак, Сергей Петрович Домогатский, Сергей Владимирович Крашенинников, Сергей Иванович Белоусов, Екатерина Андреевна Воротеляк*
Влияние матрикса высокой плотности на поведение клеток дермы кожи человека в трехмерных конструкциях 253
- Ольга Николаевна Чернова, Михаил Олегович Мавликеев, Андрей Павлович Киясов, Роман Вадимович Деев*
Репаративная регенерация скелетных мышц у животных с мутацией в гене DYSF 253
- Вера Сергеевна Чернонослова, Александр Александрович Гостев, Иван Сергеевич Мурашев, Андрей Анатольевич Карпенко, Павел Петрович Лактионов*
Материалы для инженерии кровеносных сосудов на основе полиуретанов, изготовленные методом электроспиннинга ... 254
- Михаил Витальевич Чернолуцкий, Ольга Викторовна Волкова, Михаил Николаевич Калинин, Майя Борисовна Белякова, Наталья Валериевна Костюк, Михаил Владимирович Миняев*
Влияние предварительной гормонотерапии дексаметазоном на остеогенную дифференцировку мультипотентных клеток жировой ткани кролика 254
- Елена Александровна Чернявская*
Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых и старых крыс с алиментарным ожирением на фоне введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови 255
- Вадим Игоревич Чечехин, Анастасия Михайловна Иванова, Петр Алексеевич Тюрин-Кузьмин, Вероника Юрьевна Сысоева, Наталья Игоревна Калинина*
Нарушение чувствительности к норадреналину в иммортализованных мезенхимных стромальных клетках 255
- Дарья Сергеевна Чулпанова, Севиндж Камаловна Клетухина, Лейсан Газинуровна Тазетдинова, Альберт Анатольевич Ризванов, Валерия Владимировна Соловьева*
Анализ противоопухолевых свойств внеклеточных везикул мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией родственного фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующего лиганда (TRAIL) 256
- Дарья Сергеевна Чулпанова, Валерия Владимировна Соловьева, Светлана Сергеевна Архипова, Марина Олеговна Гомзикова, Екатерина Евгеньевна Гаранина, Альберт Анатольевич Ризванов*
Исследование противоопухолевой и иммуномодулирующей активности мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией интерлейкина 2 256
- Евгения Юрьевна Шабалина, Екатерина Юрьевна Скорова, Елена Владимировна Петерсен*
Трехмерные клеточные модели: оценка миграции клеток на пластиковой, коллагеновой и матриксной подложках 257
- Алиса Алмазовна Шаймарданова, Дарья Сергеевна Чулпанова, Валерия Владимировна Соловьева, Альберт Анатольевич Ризванов*
Разработка генетической конструкции, кодирующей гены α - и β -субъединицы β -гексозаминидазы А человека и анализ ее функциональности в составе генно-клеточного препарата для терапии болезни Тея-Сакса 257
- Евгения Петровна Шалина*
Формирование апаптитоподобных фосфатов кальция в условиях варьируемых параметров окружающей среды 258
- Евгения Петровна Шалина, Игорь Валерьевич Смирнов, Александр Юрьевич Федотов, Владимир Сергеевич Комлев*
Формирование апаптитоподобных фосфатов кальция в условиях варьируемых параметров окружающей среды 258
- Джиргала Владимировна Шамадыкова, Анастасия Александровна Чулкова, Екатерина Анатольевна Савченко, Галина Валериевна Павлова*
Поиск новых изоформ глиального нейротрофического фактора (GDNF), обладающих нейрональными индукторными свойствами 259
- Елена Юрьевна Шаповалова, Татьяна Анатольевна Бойко, Юрий Геннадиевич Барановский, Николай Петрович Барсуков, Марина Николаевна Морозова, Алексей Геннадиевич Барановский*
Новый подход к профилактике незстетических рубцов при использовании культуры аллогенных фибробластов 259
- Нина Валерьевна Шаронова, Римма Алексеевна Полтавцева, Виктор Юрьевич Тимошенко, Владимир Александрович Олейников, Елена Викторовна Свирищевская*
Эффект наночастиц на основе кремния на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток 260

<i>Елена Валерьевна Шафеев, Юлия Петровна Новикова, Мария Анатольевна Александрова</i> Изучение регенеративных возможностей пигментного эпителия сетчатки человека на примере линии ARPE-19	260	<i>Татьяна Александровна Шнайдер, Олег Леонидович Серов</i> Изучение роли гена CNTN6 в ранних этапах нейрогенеза человека на модели церебральных органоидов	265
<i>Ольга Александровна Шашкова, Илья Валерьевич Смирнов, Агния Александровна Пиневиц, Наталья Леоновна Вартанян, Марина Платоновна Самойлович, Владимир Борисович Климович</i> Создание штамма крысиных клеток, экспрессирующих CD105 человека	261	<i>Михаил Исаакович Штильман, Александр Анатольевич Артюхов, Анна Леонидовна Лусс, Андрей Николаевич Кусков</i> Биоматериалы и регенеративная медицина ...	265
<i>Константин Васильевич Шевырев, Геннадий Алексеевич Оноприенко, Виктор Парфентьевич Волошин, Дмитрий Владимирович Мартыненко, Сергей Александрович Ошкуров, Евгений Викторович Степанов</i> Применение регенерируемых материалов в лечении несращений длинных костей	261	<i>Евгений Александрович Шуман, Артем Владимирович Коротков, Олег Германович Макеев</i> Введение генно-модифицированных ММСК ЖТ интрамиокардиально для коррекции патогенетических механизмов коронарной недостаточности	266
<i>Владимир Владимирович Шерстюк, Гузель Ильдаровна Давлетшина, Сурен Минасович Закиян</i> Тестирование систем CRISPR/Cas на плюрипотентных клетках крысы	262	<i>Ирина Александровна Шурыгина, Наталья Ильинична Аюшинова, Елена Евгеньевна Чепурных, Михаил Геннадьевич Шурыгина</i> Активация MAP-киназных каскадов при репаративном процессе	266
<i>Анатолий Борисович Шехтер, Владимир Иванович Тельпухов, Дмитрий Сергеевич Суслин, Наталия Николаевна Воробьева, Юрий Викторович Герасимов, Алла Германовна Грошева, Семен Николаевич Чурбанов, Алексей Леонидович Файзуллин, Александра Валерьевна Бутенко, Петр Сергеевич Тимашев, Рубен Карпович Чайлахян</i> Гистотипическая регенерация сухожильной ткани после тканевой инженерии	262	<i>Елена Сергеевна Щукина, Ирина Сергеевна Кашапова, Дмитрий Владимирович Попов, Глеб Юрьевич Косовский</i> Применение различных хирургических материалов для снижения последствий повторных операций у кроликов	266
<i>Мария Александровна Шилина, Денис Николаевич Силачев, Наталья Алексеевна Пуговкина, Ирина Викторовна Кожухарова, Ольга Геннадьевна Люблинская, Николай Николаевич Никольский, Татьяна Михайловна Гринчук</i> МСК хориона человека в условиях in vitro	263	<i>Зульфия Нурудиновна Эфендиева, Тимур Хайсамудинович Фатхудинов, Инна Анатольевна Аполихина</i> Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в лечении женщин с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия	267
<i>Ирина Николаевна Шипунова, Наталия Арнольдовна Петинати, Нина Иосифовна Дризе, Екатерина Юрьевна Чельшева, Олег Александрович Шухов, Анна Григорьевна Туркина, Елена Николаевна Паровичникова, Валерий Григорьевич Савченко</i> Изменение стромального микроокружения у больных лейкозами	263	<i>Наталия Юдинцева, Максим Шевцов, Наталья Михайлова, Татьяна Виноградова, Александр Муравьев, Игорь Самусенко, Людмила Яковлева, Вячеслав Рыжов</i> Оценка биораспределения мезенхимных стволовых клеток и эффективности клеточной терапии в комплексном лечении туберкулеза почки	267
<i>Екатерина Михайловна Шкомова</i> Биоэтические аспекты геномной медицины ...	264	<i>Кристина Алексеевна Юрова, Валерия Владимировна Шуплецова, Ольга Геннадьевна Хазиахматова, Владимир Владимирович Малащенко, Егор Олегович Шунькин, Юрий Петрович Шаркеев, Екатерина Геннадьевна Комарова, Валентина Вадимовна Чебодаева, Павел Александрович Иванов, Игорь Альбертович Хлусов, Лариса Сергеевна Литвинова</i> Оценка морфологического состояния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при культивировании в присутствии трехмерных матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани	268
<i>Анна Андреевна Шмакова, Ксения Андреевна Рубина, Анна Сергеевна Горбунова, Карина Дмитриевна Рысенкова, Полина Сергеевна Климович, Вероника Юрьевна Сысоева, Екатерина Владимировна Семина</i> Молекулярные механизмы участия урокиназной системы в опухолевой прогрессии и химиорезистентности	264		

<i>Кристина Алексеевна Юрова, Валерия Владимировна Шуплецова, Ольга Геннадьевна Хазиахматова, Владимир Владимирович Малащенко, Егор Олегович Шунькин, Юрий Петрович Шаркеев, Екатерина Геннадьевна Комарова, Валентина Вадимовна Чебодаева, Павел Александрович Иванов, Игорь Альбертович Хлусов, Лариса Сергеевна Литвинова</i>	
Влияние 3D-матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань, на дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	269
<i>Кристина Алексеевна Юрова, Валерия Владимировна Шуплецова, Ольга Геннадьевна Хазиахматова, Елена Сергеевна Мелашенко, Юрий Петрович Шаркеев, Владимир Владимирович Малащенко, Егор Олегович Шунькин, Екатерина Геннадьевна Комарова, Валентина Вадимовна Чебодаева, Павел Александрович Иванов, Игорь Альбертович Хлусов, Лариса Сергеевна Литвинова</i>	
Секреция провоспалительных цитокинов клетками, участвующими в регенерации костной ткани	269
<i>Иван Антонович Яковлев, Ирина Георгиевна Старостина, Дарья Сергеевна Чулпанова, Алиса Алмазовна Шаймарданова, Валерия Владимировна Соловьева, Альберт Анатольевич Ризванов, Роман Вадимович Деев, Артур Александрович Исаев</i>	
Применение CRISPR-опосредованной транскрипционной активации с целью создания клеточных тест-систем для разработки и проверки методов генной терапии наследственных заболеваний мышечной ткани	270
<i>Игорь Владимирович Яминский, Ольга Валентиновна Синицына, Наталья Олеговна Калинина, Михаил Эммануилович Тальянский</i>	
3D-композит на основе nanoцеллюлозы и вирусных наночастиц ВТМ для регенеративной медицины	270
<i>Евгения Викторовна Янкайте, Мария Александровна Суровцева, Ольга Владимировна Повещенко, Александр Петрович Лыков, Ирина Иннокентьевна Ким, Наталья Анатольевна Бондаренко, Ирина Юрьевна Журавлева, Александр Владимирович Богачев-Прокофьев</i>	
Оценка цитотоксичности предимплантационной обработки биопротезов ди- и пентаэпоксидами	271
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	307

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

СТРУКТУРА ЖУРНАЛА

Журнал состоит из нескольких разделов: «Обзоры», «Оригинальные исследования», «Дискуссионные и общетеоретические работы», «Stem cells business», «От редакции», «История».

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Правила представления рукописей: Для опубликования принимаются работы по всем рубрикам журнала, оформленные в соответствии с требованиями журнала.

Электронный вариант статьи на диске с полуторными интервалами между строчками, со стандартными полями (слева — 3 см, справа — 1 см, сверху и снизу — 2,5 см) должны быть отправлены по адресу:

119333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373.

Тел.: +7 (495) 646-80-76

Кроме того, все работы могут быть посланы по электронной почте, по адресу: redaktor@celltranspl.ru.

Все страницы, кроме титульного листа, должны быть пронумерованы (вверху в центре). Рукописи, оформление которых не соответствует «Правилам для авторов», могут быть отклонены редакцией. Материалы, уже опубликованные в других изданиях, или находящиеся на рассмотрении в других редакциях, будут отклонены редколлегией журнала.

Титульный лист: На титульном листе должны быть указаны фамилии и инициалы всех авторов, название статьи, место работы (наименование кафедры или лаборатории и учреждения, где выполнена работа), 5–10 ключевых слов. Оригинальные исследования должны быть завизированы руководителем учреждения, где выполнена работа.

Резюме: Все статьи должны содержать резюме на русском и английском языках объемом не более 250 слов (редколлегия имеет право сокращать резюме, превышающие указанный объем). В резюме должны быть изложены цели исследования, основные процедуры (отбор объектов изучения или лабораторных животных, методы наблюдения или аналитические методы), основные результаты (по возможности, конкретные данные и их статистическая значимость) и основные выводы.

Текст: Текст необходимо печатать в редакторе Word на бумаге формата А4, шрифтом Times New Roman, 14 размера, без переносов. Все страницы должны быть пронумерованы вверху в центре. Материал и методы исследования должны быть описаны детально с точным указанием использованных реактивов, фирмы изготовителя и страны. Если в статье имеется описание наблюдений на человеке, не следует использовать фамилии, инициалы больных или номера историй болезни, особенно на рисунках и фотографиях. Кроме того, в таких статьях необходимо указывать, подписывал ли больной информированное согласие, есть ли одобрение этического комитета

и ученого совета учреждения, где данное исследование было выполнено. Статьи, не содержащие этой информации, будут отклонены редакцией.

При изложении экспериментов на животных следует указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета и национальным законам.

Последняя страница: На последней странице надо поставить подписи всех авторов, указать полностью их фамилии, имена, отчества, ученую степень, а также почтовый адрес, телефон/факс, электронный адрес автора, с которым следует вести переписку.

Иллюстрации: Журнал принимает в качестве иллюстраций оригинальные схемы, фотографии, микрофотографии и графики. Все рисунки и графики должны быть присланы отдельными файлами в формате tiff с первоначальным разрешением 300 dpi, линейным размером по ширине не менее 7 см. Обозначения допускаются только в распечатанном варианте или в копиях рисунков. Графики должны быть выдержаны в серо-зеленой гамме. За качество воспроизведения несоответствующих требованиям иллюстраций редакция ответственности не несет, либо они исключаются.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

Библиографические ссылки в тексте: все ссылки должны быть процитированы в тексте и пронумерованы последовательно, в порядке их первого упоминания в тексте, арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии со списком литературы, данным в конце статьи.

Список литературы: при цитировании необходимо использовать номенклатуру названий журналов, рекомендованную Index Medicus в формате NLM — список названий может быть получен в NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). Цитирование по системе автор-дата не допускается.

Должны быть упомянуты все авторы; в случае, если авторов пять или больше, перечислите первых трех и добавьте «и соавт.» (et al.). Авторский коллектив несет полную ответственность за точность и полноту всех ссылок и за правильность цитирования в тексте.

Примеры цитирования различных литературных источников

Журнальная статья:

Vega K.J., Pina L., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pan-creatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124(II): 980–3.

Если в томе сохраняется последовательная нумерация страниц, номер журнала можно не указывать:

Vega K.J., Pina L., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 980–3.

Организация в качестве автора:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med. J. Aust. 1996; 164: 282–4.

Автор не указан:

Cancer in South Africa [editorial]. S. Afr. Med. J. 1994; 84: 15.

Том с приложением:

Shen H.M., Zhang Q.F. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect. 1994; 102 Suppl 1: 275–82.

Том, разделенный на части:

Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann. Clin. Biochem. 1995; 32(Pt 3): 303–6.

Журнал, номера которого не объединяются в тома:

Turan L., Wredmark T., Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin. Orthop. 1995; (320): 110–4.

Физические лица в качестве авторов книги:

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Редакторы, составители в качестве авторов книги:

Norman I.J., Redfern S.J., editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Организация в качестве автора и издателя:

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

Глава в книге:

Phillips S.J., Whisnant J.P. Hypertension and stroke. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

Материалы конференции:

Kimura J., Shibasaki H., editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15–19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Доклад на конференции:

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O., editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

Научный или технический отчет:

Smith P., Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.

Диссертация:

Kaplan S.J. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Патент:

Larsen C.E., Trip R., Johnson C.R., inventors; No-voste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Кодекс Федеральных правил:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Словари и аналогичные издания:

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119–20.

Классическая литература:

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13–16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Неопубликованные материалы / Материалы в печати:

Leshner A.I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

Публикация из Internet:

Poddubny I.V., Vasiliev A.V., Faizullin A.K. et al. Tissue engineering reconstruction of urethra in children suffering severe hypospladias: experimental and clinical findings. [http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES\[1\]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806](http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806).

РАЗМЕР РУКОПИСИ**Обзорные статьи:**

не более 30 страниц машинописного текста.

Оригинальные исследования:

не более 15 страниц машинописного текста.

Исторические статьи:

не более 15 страниц машинописного текста.

ПОДГОТОВКА СТАТЬИ К ПУБЛИКАЦИИ

Редакция имеет право вести переговоры с авторами по уточнению, изменению или сокращению рукописи. Все присланные материалы по усмотрению редколлегии направляются для рецензирования членам редакционного совета или экспертам-консультантам в данной области. Принятые статьи публикуются бесплатно. Рукописи и оттиски статей авторам не высылаются. Редакция оставляет за собой право вносить в текст рукописей, принятых к опубликованию, терминологические, стилистические и грамматические правки, изменять количество и корректировать иллюстрации и таблицы. После опубликования в журнале «Гены & клетки» материалы могут быть размещены на сайте <http://www.celltranspl.ru>.

Редакция журнала в обязательном порядке заключает с авторами договор о передаче авторских прав. Образец договора находится на сайте журнала.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

JOURNAL STRUCTURE

The journal includes several sections such as «Reviews», «Original Research», «Discussion and Theoretical Background», «Stem cells business», «Editorial's», «History».

GENERAL INSTRUCTIONS

Submission: Contributions to any aspect the journal covers that meet the requirements are accepted for publication.

Manuscripts must be sent to 119991 Moscow, Gubkina st. b. 3-2.

Tel. +7 (495) 646-80-76 in two copies and on disc, 1.5 line spaced with 3-cm left, 1-cm right and 2,5-cm top/bottom margins.

Besides, manuscripts except the original research may be submitted by e-mail redaktor@celltranspl.ru.

All pages except the title page should be numbered (at the upper center). Manuscripts could be returned shelved to the authors unless they satisfy the General Instructions requirements. Materials published elsewhere or being under consideration by another journals will be rejected.

Title page: The title page should include the names of all the authors, a short running title, affiliations (names of department[s]/ laboratory[ies] and institution[s] where the work was done), 5 to 10 key words. The name, the highest academic degrees of the institution head should be provided within the brackets. The original investigation reports must be proved by the head of the institution where the study is held.

Abstract: A 250-word abstract should be provided for all articles. [The editorial department will edit abstracts that are too long.] The abstracts should include the aims of investigation, general procedures (selection of objects to be studied or laboratory animals, methods of investigation or analysis), results (specific findings and their statistic significance), and conclusion. Abstract will be translated into Russian by the publisher's editorial department.

Text: The text should be a Word-processed A4 format document in the 14-th Times New Roman font without hyphens. All pages should be numbered in the upper center. Complex formulae and citations should be signed on the margins by authors. Materials and methods of the investigation should be described in details, with the proper names of reagents used, their producers and country. In case reports, patients' names, history identifications especially in pictures or photographs should be omitted. In case of people participation in the clinical research, provide the information if they signed the informed consent as well as is there is the approval of the ethic committee and that of the scientific board of the institution where this investigation was performed. Manuscripts that do not provide this information will be rejected.

In case of reports on experimental animals, indicate if the experiment was held according to the rules of keeping and handling experimental animals accepted in your institution, the national laws and the international regulations.

Last page: The last page should include the signatures of all the authors, their full names, the highest academic degrees and the corresponding author's complete mailing address, telephone/fax and e-mail.

Illustrations: As illustrations original schemes, pictures, micrographics, diagrams are accepted for publication. All the pictures and diagrams should be provided as separate files in a tiff format with the primary resolution of 300 dpi and the linear width of not less than 7 cm. Legends are acceptable only on a printed copy or on picture copies. Diagrams should be grey and green.

The edition does not guarantee a high quality of reproduction of inappropriate illustration(s), and reserves the right not to reproduce an illustration(s) unless its quality meets the editorial requirements.

REFERENCES

Citation in text: All references should be cited in the text and numbered consecutively using Arabic numbers in square brackets in accordance with the list given in the end of the article.

Reference list: Presentation of the references should be based on NLM formats in Index Medicus. The author-date system of citation is not acceptable. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus. The list of Index Medicus — indexed journals could be obtained at NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). All authors should be listed; if there are five authors and more, only the first three should be listed, followed by «et al.». Authors bear total responsibility for the accuracy and completeness of all references and for correct text citation.

SPECIFIC FORMATS

Review articles:

not more than 30 pages of typewritten text.

Original research:

not more than 15 pages of typewritten text.

Historical material:

not more than 15 pages of typewritten text.

EDITORIAL ASSESSMENT AND PROCESSING

The editorial department reserves the right to consult the authors about refinement, modifying or shortening manuscripts. All contributions to the journal could be peer reviewed by members of the Editorial Board or submitted to expert consultants at the discretion of the editorial department. Accepted materials are published free of charge. Manuscripts and facsimile copies are not returned to the authors. Having been published in «Genes & Cells» materials will be published at <http://www.genescells.com>.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
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 генотерапевтический 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 генетической 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



+7 (495) 646-80-76



www.genescells.ru