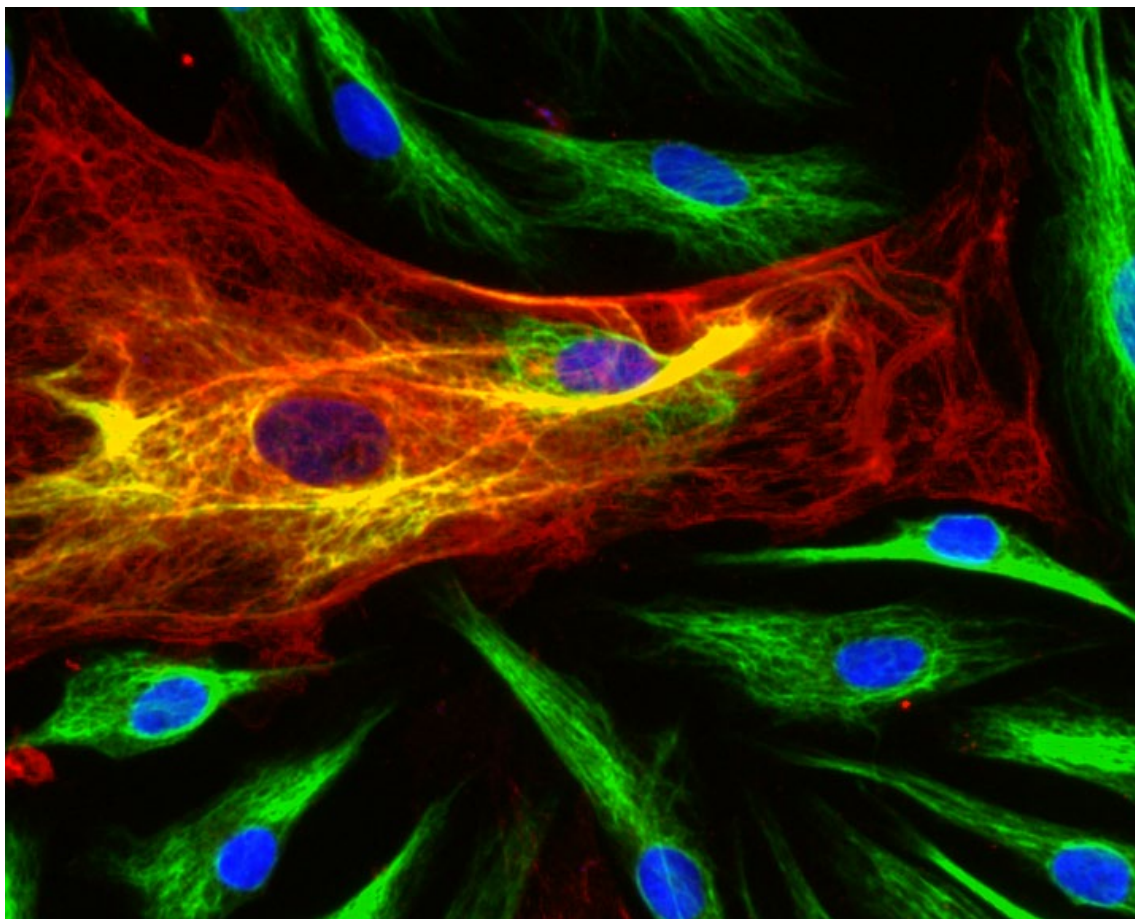


Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**МАТЕРИАЛЫ
V НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА
ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЕ**

Москва, 23–25 ноября 2022 г.

www.genescells.ru

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

Genes & Cells

Vol. XVII, №3, 2022

© Human Stem Cells Institute, 2022

ISSN 2313-1829

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Гены & Клетки

Том XVII, №3, 2022

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 North-Western State Medical University
(Saint Petersburg)

Executive Editor

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

Editorial Board:

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
Central Clinical Hospital of the RAS (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
(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)

T.H. Fathudinov
Research Institute of Human Morphology (Moscow)

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
B.V. Petrovsky Russian Research Centre of Surgery (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:

S.N. Bardakov (Saint-Petersburg)
A.V. Bersenev (San-Francisco, USA)
A.G. Chogovadze (Moscow)
A.Y. Efimenko (Moscow)
I.I. Eremin (Moscow)
G. Feichtinger (Vienna, Austria)
P.I. Makarevich (Moscow)
I.V. Potapov (Moscow)
O.V. Tyumina (Samara)
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
"Neurovita" Clinic (Moscow)

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

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
Doctor of medical sciences

Ye.V. Parfyonova
National Medical Research Center of Cardiology (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. Tsyberg
"Biovitrum" Co. Ltd. (Saint-Petersburg)

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 (Санкт-Петербург)

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.)

В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

А.С. Брюховецкий

Центральная клиническая больница РАН (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

(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

Российский научный центр хирургии им. Б.В. Петровского (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)

А.А. Масчан

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

Адрес редакции:

1 19333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 2, а/я 373
Тел./факс: +7 (495) 734-91-70. E-mail: redactor@genescells.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

Электронная версия журнала www.genescells.ru
ISSN электронной версии: 2500-2562

Редакционная коллегия:

С.Н. Бардаков (Санкт-Петербург)
А.В. Берсенев (Сан-Франциско, США)
И.И. Еремин (Москва)
А.Ю. Ефименко (Москва)
П.И. Макаревич (Москва)
И.В. Потапов (Москва)
О.В. Тюмина (Самара)
Г. Файштингер (Вена, Австрия)
Н.В. Цупкина (Санкт-Петербург)
А.Г. Чоговадзе (Москва)

С.А. Матвеев

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

Г.Л. Менткевич

Клиника «Нейровита» (Москва)

Ш.М. Миталипов

Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

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

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии (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)

Т.Х. Фатхудинов

Научно-исследовательский институт морфологии человека (Москва)

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» (Санкт-Петербург)

Е.И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Свидетельство о регистрации

Эл № ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И.А. Яковлев
Верстка С.А. Климентовский

Подписано в печать 16.11.2022. Формат бумаги 60×84/8.

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

Тираж 100 экз. Заказ № 6129.

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

Материалы конференции, списки цитируемой литературы опубликованы
с сохранением орфографии и пунктуации авторов.

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



Глубокоуважаемые коллеги!

Как Президент V Национального конгресса по регенеративной медицине хотел бы выразить свою благодарность всем участникам, докладчикам, молодым ученым и учащимся - авторам тезисов, входящих в настоящий сборник.

В этом году мы вновь публикуем тезисы Конгресса при поддержке журнала «Гены и клетки» - одного из ведущих отечественных периодических изданий в области биологии клетки и биомедицины. Научная составляющая любого масштабного мероприятия формируется именно учеными, представляющими свои фундаментальные, прикладные и клинические работы в виде тезисов, а уровень Конгресса в течение последних лет неизменно оставался высоким именно благодаря Вашим стараниям.

Огромные усилия, приложенные каждым исследователем в ходе работы, были по достоинству оценены и мы надеемся, что для многих эти публикации станут важными вехами в успешной научной карьере и шагами на пути к новым открытиям и достижениям.

В этом году количество участников Конгресса вновь превышает 1000 человек, и мы получили более 500 тезисов со всей страны. Среди авторов как маститые исследователи, так и молодые врачи и ученые – аспиранты, ординаторы, студенты, связавшие свою научную карьеру с новой наукой – регенеративной медициной. Мы рады видеть рост этой области и неослабевающее внимание со стороны фундаментальных ученых, врачей, представителей индустрии и государства. Все это позволяет нам рассчитывать на новые прорывы и интересные практические разработки и с оптимизмом смотреть в будущее, где многие современные проблемы здравоохранения будут решаться с использованием уникальных методов регенеративной медицины.

Ждем Вас на полях юбилейного, V Национального конгресса по регенеративной медицине в Московском Университете!

С уважением,
Президент Конгресса
Академик

Всеволод Арсеньевич Ткачук



МАТЕРИАЛЫ V НАЦИОНАЛЬНОГО КОНГРЕССА ПО РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Москва, 23–25 ноября 2022 г.

TISSUE REGENERATION AND CANCER: INFLAMMATION IN COMMON

T. Lopatina¹, M. Koni¹, A. Sarcinella¹, M.F. Brizzi¹

¹ Dept. of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy

e-mail: tatiana.lopatina@unit.it

Key words: cancer inflammation, IL-3, PD-L1, immune suppression.

Tissue regeneration includes inflammation as a necessary step. Inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-3, TNF α , IFN γ , and others attract immune cells in injured sites, stimulate their proliferation, and enhance the secretion of other cytokines, chemokines, and growth factors. These factors activate immune and non-immune cells and induce their migration, proliferation, or apoptosis. As a final step of regeneration pro-inflammatory factors should be replaced by anti-inflammatory, such as TGF β and IL-10. Together with immunosuppressive T regulatory cells these factors inhibit cytotoxic T-cells and decrease inflammation. In addition, they stimulate angiogenesis, nerve growth, and proliferation of fibroblasts and other cells. The success of tissue regeneration depends on finalization of inflammation and cell activation [1]. Healthy tissue usually is not infiltrated with immune cells and does not develop new vessels or nerves. Prolonged activation of myofibroblasts, immune cells, pericytes, and others cells, and continued release of inflammatory and growth factors, named chronic inflammation, is considered as one of the first causes of cancer [2]. Unresolved chronic inflammation is implicated in all stages of cancer development. Signaling pathways involved in normal tissue regeneration is dysregulated in cancer. Using IL-3 as an example, we describe how cancer cells hijack inflammatory signaling to promote tumor development and metastasis spread [3]. Thus, tumorigenesis can be considered as pathologically misappropriated tissue regeneration [4].

IL-3 is an inflammatory cytokine that plays a key role in hematopoietic cell proliferation and differentiation. In sites

of tissue injury, IL-3 is released mainly by activated T-cells [5]. IL-3 specific receptor, IL-3R α , together with signal transducing beta subunit are responsible for IL-3 activation of STATs, MAPK, and PI3K pathways. In healthy subjects, IL-3R α is detected in cerebral cortex and fallopian tubes. Whereas several tumor types were shown positive for IL-3R α , suggesting the relevance of the IL-3 signalling in cancer [6].

We have shown that different types of tumor cells express IL-3R α , but unlike hematopoietic cells, IL-3 does not induce the proliferation of these cells [7]. Instead of this, stimulated with IL-3 tumor cells release several anti-inflammatory and pro-angiogenic factors, such as IL-10 and TGF β 1. The paracrine action of these cells results in the increased expression of immune suppressor PD-L1 [6], inhibition of T-cells, and enhanced angiogenesis [5]. We showed that the blocking of IL-3R α on tumor cells disrupts their immunosuppressive effect, capacity to vessel mimicry, and metastasis spread [5][6].

Our results demonstrate how pro-inflammatory IL-3 signaling could be hijacked by tumor cells to activate, attract and reprogram different types of cells (immune and endothelial) for tumor promotion.

References:

1. Eming S.A., Wynn T.A., Martin P. *Science*. 356 (2017) 1026–1030. <https://doi.org/10.1126/science.aam7928>.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
3. Lopatina T., Sarcinella A., Brizzi M.F. *Cancers*. 14 (2022) 4020. <https://doi.org/10.3390/cancers14164020>.
4. Ratajczak M.Z., Bujko K., Mack A. et al. *Leukemia*. 32 (2018) 2519–2526. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0294-7>.
5. Lopatina T., Grange C., Cavallari C. et al. *Oncogenesis*. 9 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00274-y>.
6. Lopatina T., Koni M., Grange C. M et al. *Pharmacol. Res.* 179 (2022) 106206. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106206>.
7. Koni M., Castellano I., Venturelli E. et al. *Cancers*. 14 (2022) 3918. <https://doi.org/10.3390/cancers14163918>.

SYNTHETIC OLIGOPEPTIDE-MODIFIED BIOMATERIALS

M. Zoughaib, T.I. Abdullin

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: mohamadzoughaib@gmail.com

Keywords: hydrogel biomaterials, synthetic oligopeptides, tissue engineering, drug delivery.

Biomaterials composed of natural or synthetic components have gained much attention owing to their important roles and promises in the field of tissue engineering and regenerative medicine. Modification of biocompatible materials with active components is commonly required to confer sufficient regenerative properties related to the induction of specific cell responses and boosting tissue growth. Recombinant proteins and growth factors with pleiotropic activities are one of the most effective biologics to activate biomaterials. However, they feature major limitations due to their high cost, potential immunogenicity and low stability. A promising strategy to overcome these limitations is based on the use of oligopeptide sequences, which resemble structure and activity of functional sites of full-length proteins. Such oligopeptides can be produced with high purity by solid-phase synthesis technique, which also provides convenient methods for modification of the peptide sequences in order to improve their properties and facilitate their combination with biomaterials.

In this presentation, we give an overview of synthetic oligopeptides as a powerful multifunctional component to develop improved biomaterials both for tissue engineering and drug delivery applications. The specific design of oligopeptides and biomaterials is considered to perform their controllable combination and provide availability of immobilized peptides for biointeractions.

In particular, we have demonstrated that the activation of macroporous hydrogels (cryogels) with compositions of ECM-derived oligopeptides can effectively regulate cell behavior in the materials. To reveal peptide activities, pHEMA/PEG/ β -cyclodextrin synthetic composite cryogel was developed and in situ modified with adamantylated RGD and GHK peptides via host-guest interactions. The resulting biomaterial was proven as an informative ECM model to study specific in vitro effects of multiple peptide factors in 3D environment. The synergistic effect of RGD and GHK peptides on proliferative activity of different mammalian cells was established [1]. Furthermore, co-modification of the cryogels with RGD, GHK, and copper (II), enhanced the angiogenic effects, proliferation, differentiation, and the production of pro-angiogenic cytokines and growth factors in primary endothelial cells (HUVECs) [2]. As shown recently, RGD and GHK peptides when immobilized on the liposomal surface have the joint potential in enhancing intracellular drug delivery [3]. Our results suggest an effective methodology for the development of advanced synthetic oligopeptide based soft biomaterials. The study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 22-74-00082 and by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project FZSM-2022-0020).

References:

1. Luong T.D., Zoughaib M., Garifullin R., et al. ACS Appl. Bio Mater. 2020. V. 3. P. 1116
2. Zoughaib M., Luong D., Garifullin R., et al. Mater. Sci. Eng. C. 2021. V. 120. P. 111660
3. Zoughaib M., Pavlov R., Gaynanova G. et al. Materials Advances. 2021. V. 2. P. 7715.

УЧАСТИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ NRF2, HIF, CAR И PXR В РЕГУЛЯЦИИ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА КЛЕТКАХ ЛИНИИ CACO-2

Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Ключевые слова: Р-гликопротеин, окислительный стресс, вестерн-блот, клетки линии Caco-2, Nrf2, HIF-1 α , CAR, PXR.

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1) — АТФ-зависимый белок-транспортер, участвующий в транспорте эндогенных и экзогенных веществ. Известно, что активность и экспрессия Pgp может изменяться под воздействием ряда веществ и факторов. Настоящее исследование посвящено изучению механизмов регуляции Pgp при развитии окислительного стресса (ОС).

Работа выполнена на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). В ходе эксперимента были смоделированы — экзогенный (добавление пероксида водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ, 72 ч) и эндогенный ОС (D,L-бутионинсульфоксимин в концентрациях 1–500 мкМ, 24 ч). Оценку роли транскрипционных факторов проводили с применением соответствующих ингибиторов: для Nrf2 — АЕМ1 («Sigma Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [1]; HIF1 — KC7F2 («Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ [2]; CAR — CINPA 1 («Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [3]; PXR — кетоконазол, 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) [4]. Гиперпродукцию АФК под действием используемых прооксидантов подтверждали с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H2 XROS («Invitrogen», США). Определение относительного количества Pgp в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.

Экспозиция клеток линии Caco-2 с H₂O₂ приводила к генерации АФК через 3 ч, а при воздействии БСО — 24 ч. Развитие экзогенного и эндогенного ОС приводит к увеличению относительного количества Pgp. С помощью применения специфических ингибиторов установлено, что при повышении количества Pgp в условиях моделирования экзогенного ОС пероксидом водорода, вероятно, первостепенная роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1, который принимает участие в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF1 участвует в регуляции Pgp при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR — при длительности инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели. В условиях моделирования эндогенного ОС все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути участвуют в индукции Pgp. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgp: с одной стороны он вызывает развитие ОС, с другой стороны, являясь ксенобиотиком, может стимулировать PXR и CAR, которые, в свою очередь, повышают экспрессию Pgp.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1856.2020.7.

Литература:

1. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L., Schultz P.G. ACS Chemical Biology. 2015. V. 10. № 2193–2198.
2. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) Mol Pharmacol. 2006. V.70.P. 1469–80.
3. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. Mol Pharmacol. 2015. V. 87. № 5. P. 878–89.
4. Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D. Pharmacol Res. 2010. V. 62. P. 426–431.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ YAP — СИГНАЛИНГА НА КОНТРАКТИЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В МОДЕЛИ ЭКВИВАЛЕНТА ДЕРМЫ

**Д.С. Аболин^{1,2}, О.С. Роговая¹,
Е.П. Калабушева¹, Е.А. Воротеляк¹**

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² Российский Химико-Технологический Университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

e-mail: danilabolin@mail.ru

Ключевые слова: Фибробласты, дерма, фиброзный рубец, коллагеновый гель, 3D-культивирование клеток, YAP, YAP-сигналинг, вертепорфин.

Кожные раны обычно заживают через фиброзный процесс с образованием деформаций — шрамов. Фибробласты (ФБ) глубоких слоев дермы в ответ на повреждение активируются и реагируют увеличением секреции коллагена для быстрого закрытия дефекта, при этом рана сжимается (контрактирует). Увеличение жесткости внеклеточного матрикса (ВКМ) в процессе рубцевания влияет на изменение состояния ФБ, тем самым запускается «петля обратной связи»: с одной стороны, активация ФБ влияет на жесткость ВКМ, а изменения в жесткости ВКМ запускает активацию ФБ, втягивая в процесс все больше клеток. Понимание клеточных и биохимических механизмов фиброза кожи позволит выявить мишени для медикаментозного ингибирования фиброза.

Цель работы: исследовать возможность ингибирования формирования рубца в модели контракции коллагенового геля клетками дермы.

Было показано, что дермальные ФБ в нормальной коже экспрессируют белок YAP преимущественно в цитоплазме. В рубце происходит активация YAP-сигналинга, что увеличивает накопление данного белка в клеточных ядрах [1, 2]. При культивировании клеток в стандартной двухмерной культуре — на пластике их фенотип изменен, при этом помещение клеток в коллагеновый гель возвращает им нормальный фенотип. Исходя из этого, мы предположили, что модель трехмерного геля более адекватна для проверки влияния на поведение клеток лекарственных средств, в частности вертепорфина (ВП). ВП использовали как ингибитор YAP-сигналинга [3]. Внесенный в культуральную среду в на 1 сутки он не токсичен для ФБ культивируемых на пластике и не влияет на экспрессию маркеров PDGFR α , YAP и SM22 α . Доля клеток экспрессирующих маркер пролиферирующих клеток Ki67 сразу после воздействия снизилась с 22,6% до 5,8%, восстановление до контрольных значений наблюдали через 7 суток. Было выявлено, что при временном внесении ВП на контрактирующий коллагеновый гель происходит ингибирование активации YAP, что проявляется в отсутствии данного белка в ядрах. Также

происходит ингибирование экспрессии профибротического маркера SM22 α и замедление контракции геля.

Таким образом ВП ингибирует переход ФБ в фиброзный фенотип в коллагеновом геле, что снижает его контракцию. Это дает нам основания предполагать, что ВП может быть рассмотрен, как компонент лекарственных средств, направленных на предотвращение образования рубца.

Литература:

1. Raghunathan, Vijay Krishna et al. Investigative ophthalmology & visual science vol. 54,1 378–86. 14 Jan. 2013.
2. Liu F. et al. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2015. Vol. 308, № 4. P. L344–L357.
3. Shi-Wen X, Racanelli M, Ali A et al. J Cell Commun Signal. 2021 Mar;15(1):71–80.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ ОСТЕОМИЕЛИТА НА СЕГМЕНТАРНОМ ДЕФЕКТЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ У КРЫС

С.М. Авдокушина, Е.О. Стаценко, А.А. Ергешов

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: sveta.avdokushina@gmail.com

Ключевые слова: модель остеомиелита, бедренная кость, остеозамещающие материалы, компьютерная микротомография.

Остеомиелит — инфекционный гнойно-некротический процесс в кости — является одним из наиболее тяжелых и опасных осложнений, связанных с имплантацией ортопедических устройств и остеозамещающих материалов. Местный остеомиелит часто обусловлен образованием бактериальных биопленок на имплантируемых материалах, сопровождается инфицированием прилегающих костных тканей с последующим остеоллизом и отторжением имплантата. Актуальной задачей является разработка удобных и информативных *in vivo* моделей для оценки антибактериального и регенеративного действия остеозамещающих материалов.

С учетом имеющихся данных литературы оптимизирована модель сегментарного дефекта бедренной кости у крыс, формируемого на латеральной поверхности и гребнем. После обеспечения доступа к кости на ней хирургически проделывали прямоугольный дефект размером ~0,5×0,2 см. Инфицирование проводили путем нанесения и распределения в объеме раны ночной культуры *Staphylococcus aureus* (10 мкл, 10⁵ КОЕ/мл). Экспериментальные остеозамещающие материалы в форме порошка массой не более 100 мг имплантировали в область дефекта.

С использованием компьютерной микротомографии (микро-КТ) получены и проанализированы 3D-изображения в области костных дефектов в период проведения острого эксперимента (до 30 дней). Сравнительный анализ проводили посредством математических методов оценки объема костной ткани, ее плотности, толщины и других характеристик с помощью программы Image J (Fiji, plug-in BoneJ). Измерения показали, что исследуемая область кости имеет почти цилиндрическую форму, что способствует более точному расчету параметров кости. Кроме того, измерения показали воспроизводимость объема формируемого дефекта в исследуемой области кости. В период с 14 по 30 сутки

выявлены разнонаправленные количественные изменения параметров кости для неинфицированных и инфицированных дефектов. В частности, в первом случае происходил постепенный рост и структуризация костной ткани, а во втором случае наблюдалась деградация костной массы вследствие распространения инфекции. По данным микро-КТ экспериментальные материалы оказывали выраженное влияние на указанные процессы в зависимости от наличия антибактериальных агентов.

Полученные результаты подтверждают информативность используемой модели и параметров оценки методом микро-КТ для изучения терапевтического потенциала остеозамещающих материалов. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

ПОЛУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПЭГ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СОВМЕСТИМОСТИ С НЕЙРОНАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

С.М. Авдокушина, М.И. Камалов, Т.И. Абдуллин, И.А. Лавров, М. Зухайб

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: sveta.avdokushina@gmail.com

Ключевые слова: нейрорегенерация, биоматериалы, биосовместимые и биodeградируемые полимеры, полиэтиленгликоль.

Травматические повреждения нервной системы широко распространены в человеческой популяции и характеризуются значительными инвалидизацией, ухудшением качества жизни пациентов, расходами на первичную терапию и реабилитацию. Эффективное восстановление структуры и функции нервных тканей после травмы требует применения комплексных терапевтических методов, важной частью которых являются биоматериалы, способные замещать тканевой дефект и стимулировать регенерацию. Перспективной структурной основой для создания подобных биоматериалов являются биосовместимые гидрофильные полимеры. Ранее нами были разработаны гидрогели на основе гидроксизтилметакрилата, модифицированные биоактивными олигопептидами, в качестве клеточных матриц [1].

Целью настоящего исследования явилось создание биосовместимого гидрогеля на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), обладающего пористой структурой, биodeградируемыми свойствами и поддерживающего рост нейрональных клеток. Для решения этой задачи синтезировано производное ПЭГ — олиго(поли(этиленгликоль) фумарат) (OPF), структура которого была подтверждена методами ИК-Фурье- и ЯМР-спектроскопии. Получен ряд макропористых OPF-криогелей различного состава и исследовано их взаимодействие с клетками феохромоцитомы крысы PC-12 и нейробластомы человека SH-SY5Y. По данным тестов на адгезию и жизнеспособность исследуемые клетки эффективно закреплялись и пролиферировали на OPF-криогелях; введение в криогель катионного компонента существенно усиливало эти процессы (более эффективно для клеток PC-12 по сравнению с клетками SH-SY5Y). Микроскопическими методами охарактеризованы распределение и морфология клеток в OPF-криогелях.

Результаты показывают, что OPF-криогели являются перспективными матриксами для нейрональных клеток. В настоящее время проводятся работы по модификации OPF-криогелей биоактивными компонентами, стимулирующими пролиферацию и дифференцировку нейрональных клеток для их последующего тестирования в моделях нейрорегенерации. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00082 и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

Литература:

1. Zoughaib M., Luong D., Garifullin R., et al. Mater. Sci. Eng. C. 2021. V. 120. P. 111660.

ВИСЦЕРАЛЬНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА СПОСОБСТВУЮТ НАКОПЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЗДОРОВЫХ АДИПОЦИТАХ

М.Ю. Агарёва^{1,2}, Ю.С. Стафеев², С.С. Мичурина^{1,3}, Е.С. Зубкова¹, И.А. Скляник⁴, Е.А. Шестакова⁴, А.О. Гаврилова⁴, М.С. Синеокая⁴, Е.И. Ратнер¹, М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфенова^{1,3}, М.В. Шестакова⁴

¹ ФГБУ НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

² МИРЭА — Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

⁴ ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: amarro1999@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, адипоциты, сахарный диабет 2 типа, свободные жирные кислоты, сокультивирование, сальник.

Адипоциты являются основными клетками жировой ткани, их функция заключается в хранении энергии в виде триглицеридов и способности высвобождать ее при необходимости в виде жирных кислот и глицерина, обеспечивая тем самым другие клетки и ткани энергией. Кроме того, адипоциты являются важными эндокринными клетками, секретируемые факторы которых могут оказывать дистантное действие на другие ткани и органы. В связи с этим, целью нашей работы является изучение влияния висцеральных адипоцитов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пациентов с ожирением и наличием/отсутствием сахарного диабета 2 типа (СД2Т) на подкожные адипоциты, полученные из МСК здоровых пациентов.

Эксперимент проводили на пулированных культурах МСК подкожной жировой ткани (пМСК) здоровых пациентов и МСК висцеральной жировой ткани (вМСК) пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т. Сокультивирование осуществляли в системе Transwell в среде с адипогенными индукторами по стандартному протоколу. Для анализа липогенеза мы инкубировали клетки с радиоактивно-меченой [¹⁴C]-глюкозой с дальнейшей экстракцией и омылением липидной фракции. Включение радиоактивного углерода оценивали на счетчике бета-излучения с использованием жидкостной сцинтилляции. Экспрессию липогенных маркеров контролировали с помощью иммуоблоттинга.

В ходе работы было обнаружено, что содержание радиоактивного углерода во фракции с жирными кислотами выше при совместном адипогенезе с вМСК пациентов с ожирением и СД2Т. Анализ экспрессии липогенных маркеров показал снижение уровня рACC-S79 в группах при совместном адипогенезе с вМСК, что может говорить о синтезе жирных кислот de novo вне зависимости от наличия диагноза СД2Т. При этом экспрессия III комплекса дыхательной цепи снижается при совместном адипогенезе с вМСК, а экспрессия ТОММ20 для всех групп одинакова, что говорит о снижении активности митохондрий после совместного адипогенеза вне зависимости от наличия СД2Т.

Таким образом, вМСК пациентов с ожирением и наличием/отсутствием СД2Т могут активировать de novo синтез жирных кислот при адипогенезе здоровых пМСК. При этом совместный адипогенез с вМСК от пациентов с СД2Т увеличивает накопление жирных кислот адипоцитами, полученными из пМСК здоровых пациентов. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00365.

МЕМБРАНОМИМЕТИЧЕСКИЕ ПРОТОНООБМЕННЫЕ СТРУКТУРЫ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНЫХ СКАФФОЛДОВ С МЕТАСТАБИЛЬНЫМИ НАНОКАНАЛАМИ

Е.Д. Адамович¹, Е.Л. Бурьянская^{1,2}, О.В. Градов¹

¹ ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия

² НИТУ МИСиС, Москва, Россия

e-mail: o.v.gradov@gmail.com

Ключевые слова: нафион, ионообмен, протоннообменные мембраны, хемиосмос, электроосмос, наноканалы, симпорт, мембраномиметические материалы.

Общеизвестно, что нафион (PubChem ID 61889; IUPAC Name: 1,1,2,2-tetrafluoroethene; 1,1,2,2-tetrafluoro-2-[1,1,1,2,3,3-hexafluoro-3-(1,2,2-trifluoroethenoxy)propan-2-yl]oxyethanesulfonic acid — согласно нотации Lexichem TK 2.7.0 (PubChem release 2021.05.07)) активно используется в регенеративной медицине при изготовлении скаффолдов [1–5]. Его использование реализуют как в виде мембран, так и в виде добавок к другим материалам, в том числе биоккомпозитным системам. Ограниченность использования нафиона в имплантатах, регенеративной медицине и биосовместимых конструкциях, в целом, связана с существованием внезапно возникающих эффектов, не всегда предсказываемых, исходя из упрощенных эмпирических представлений. Большинство авторов из области биомедицины не представляет комплекса путей управления его биологической активностью, так как не владеет в достаточной мере физико-химическими критериями этой активности и навыками в области химической кибернетики, позволяющими управлять соответствующими свойствами с использованием правильно подобранных цепей и сетей взаимодействия физических / химических факторов (положительных и отрицательных обратных связей). Вместе с тем, сложность интерфейса между клетками / тканью и подобной мембраной напрямую связана с её биомембраномиметическими свойствами, включающими в себя перенос протона, адекватно хемиосмотической модели Митчелла, и перенос воды (чему соответствует перенос протона в форме иона гидроксония). По существу, как в модели сетей каналов (или модели кластеров), так и в модели водных каналов, речь идёт о наличии систем наноразмерных каналов (в первом случае — порядка 1 нм, во втором случае — порядка 2,5 нм), через которые возможен перенос

ионов. То есть речь идёт не просто о мембраномиметиках, а о каналомиметиках (channel mimetic) внутри псевдофендлеровских мембраномиметиков. И это существенно усложняет задачу управления, переводя её на структурный уровень. Особое место в комплексных моделях занимает метастабильная динамика перколяции молекул воды через мембрану, так как при малых концентрациях воды кластеры в мембране не связаны друг с другом, а рост содержания воды приводит к их объединению в единый канал. В то же время, протонная проводимость зависит от концентрации воды и растёт с её увеличением. То есть, в ряде случаев может идти речь об экзотических механизмах симпорта через временные поры. Также возможно воспроизведение на нафионовой мембране электрогенной машинерии переноса, напоминающей механизмы действия потенциал-зависимых каналов, а также путей диффузионного электропереноса и электроосмотических механизмов (хотя несомненно и то, что при увеличении содержания воды перепад давления превалирует над диффузией в схеме, обеспечивающей электроперенос, что соответствует известным состояниям клеточного шока в стресс-физиологии). При этом, перенос заряда и транспорт воды (являющийся симпортом в комплексе с протонным переносом, численно характеризуемым «коэффициентом увлечения» — числом молекул воды, увлекаемых при переносе протонов) взаимосвязан, что позволяет, по нашим данным, моделировать свойства передачи электрофизиологических сигналов — вплоть до элементарных функций эфаспов, с учётом псевдо-митчелловского механизма сопряжения. Дополнительно, учитывая каталитические свойства нафиона, предлагается интегрировать на подобных интерфейсах биомиметический катализ с процессами переноса.

Нами предлагается комплексная схема для управления свойствами нафионовых мембран и ряда подобных мембраномиметических структур непосредственно в теле реципиента, чему соответствует использование собственных свойств биологических жидкостей сред организма и инфузионных сред. В качестве одного из элементов контроля предлагается использование диэлектрической или импедансной спектроскопии (EIS) с контролем эквивалентных схем, по отношению к референсной базе данных («норме реакции»). Также предлагается метод ESEM для контроля морфологической / морфодинамической стабильности биологических мембран, находящихся на интерфейсе с нафионовыми мембранами, и нафионовых мембран в условиях среды, воспроизводящих биологические, для контроля комплекса процессов реакции, вплоть до изменения конфигурации пор / каналов на интерфейсе. Контроль может осуществляться в реальном времени с использованием библиотек, обеспечивающих двумерное преобразование Фурье изображения с электронного микроскопа in situ, либо после записи микрофотографий / видеопотока в память ЭВМ для корреляционно-спектрального анализа в целях сравнения с референсными изображениями из базы данных по 2D FFT-спектрам.

Литература:

1. Liu B., Sha X. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. 2011. V. 15. №. 47. P. 8809.
2. Yoon O.J., Kim C.H., Sohn I.Y., Lee N.E. Sensors and Actuators B: Chemical. 2013. V. 188. P. 454.
3. Liu B.J., Ma L.N., Su J., Jing W.W., Wei M.J., Sha X.Z. Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 2014. V. 102. №. 6. P. 2055.
4. Imani S., Zagari Z., Rezaei Zarchi S., Jorjani M., Nasri S. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2016. V. 44. №. 1. P. 144.
5. Guzzo S., Carli S., Pavan B., Lunghi A., Murgia M., Bianchi M. Nanomaterials. 2021. V. 11. №. 8. P. 2022.

ОТВЕТ ММСК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА НА БИОКЕРАМИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДО И ПОСЛЕ ПОКРЫТИЯ ЕГО КОЛЛАГЕНОМ I ТИПА

С.А. Александрова¹, Ю.А. Нащекина¹,
А.А. Гайдаш², М.И. Блинова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт общей и неорганической химии НАН
Беларуси, Минск, Белоруссия

e-mail: alekssvet2205@gmail.com

Ключевые слова: остеозамещающие материалы, биоситалл, гидроксипатит, коллаген I типа, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, жизнеспособность.

Биокерамика является одним из перспективных остеозамещающих материалов. Биоситалл силико-алюмофосфатной группы «Биосит-Ср Элкор» (ООО «ПК«ЭЛКОР», Санкт-Петербург) является синтетическим аналогом природной формы гидроксипатита. На данный момент этот материал используется в клинической практике, однако при этом были отмечены — невысокая скорость восстановления костной ткани и возникновение осложнений воспалительного характера.

В настоящей работе исследовали жизнеспособность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга кролика при культивировании на гранулах биоситалла разных фракций (0,1–0,3 мм; 0,3–0,5 мм; 0,5–1,5 мм, 2–3 мм) методами световой и электронной микроскопии, а также с помощью МТТ-теста. Жизнеспособность ММСК была значительно ниже, чем в контроле, и отличалась на различных фракциях материала. Оказалось, что в питательной среде присутствуют очень мелкие частицы материала («микрочастицы») размером до 20 мкм. Эти частицы со временем обнаруживались в цитоплазме клеток и негативно влияли на внутриклеточные процессы, вызывая клеточную гибель. Дальнейшие исследования показали, что микрочастицы механически разрушают клетку, попадая внутрь и препятствуя нормальной работе органелл. Поэтому гранулы биоситалла покрывали раствором коллагена I типа (0,1 мг/мл), полученного из хвостов крыс. С помощью СЭМ было выявлено, что ММСК хорошо адгезируют к поверхности материала, покрытого тонким слоем коллагена, а их жизнеспособность сопоставим с контролем.

Таким образом, при использовании биоситалла «Биосит-Ср Элкор» необходимо нивелировать воздействие микрочастиц, влияющих на клеточную жизнеспособность.

ЭКВИВАЛЕНТЫ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ В СТРАТЕГИИ ТЕРАПИИ РОГОВИЧНОЙ СЛЕПОТЫ

Э.И. Александер-Синклер, М.И. Блинова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: elga.aleks@gmail.com

Ключевые слова: клеточные технологии, реэпителизация, роговица, стволовые клетки, трансплантация, фармакотерапия, эквиваленты роговицы.

Нарушение целостности эпителия роговицы являются основой для развития осложнений, ухудшающих функции роговицы и приводящих к слепоте. Консервативные и хирургические методы лечения роговичной слепоты имеют как свои преимущества, так и ограничения. Целый ряд

новых возможностей в стратегии терапии роговичной слепоты связан с разработкой эквивалентов роговицы разных уровней сложности, которые могут быть использованы как в качестве моделей роговицы *in vitro* для исследования механизмов ее реэпителизации и скрининга фармакологических и токсикологических свойств лекарственных препаратов, так и для замены ткани роговицы при трансплантации. Актуальной задачей является поиск источников клеток и материалов для создания эффективных эквивалентов роговицы, которые могут стать инструментом для открытия новых вариантов терапии роговичной слепоты.

В Институте цитологии РАН, совместно с Клиникой офтальмологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и Санкт-Петербургским филиалом «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», проводятся исследования по разработке эквивалентов эпителия роговицы. Клетки, выделенные с использованием разработанных нами методов из биоптатов роговичного лимба и слизистой нижней губы человека и кролика, были введены в культуру и охарактеризованы. Клетки имеют нормальный стабильный кариотип, обладают высоким пролиферативным потенциалом и экспрессируют основные стволовые и эпителиальные маркеры (ABCБ5, ABCG2, ALDH3A1, СК15, СК14, СК3/12, СК5). Способность клеток дифференцироваться в различных направлениях подтверждает их статус мультипотентных стволовых клеток (МСК). Проведена оценка биосовместимости этих клеток со скаффолдами на основе амниотической мембраны и коллагеновых гелей. Эксперименты *in vivo* на кроликах продемонстрировали высокий потенциал использования таких конструкций для восстановления эпителия роговицы при лимбальной недостаточности. Полученные МСК и эпителиальные клетки конъюнктивы и роговицы человека были успешно использованы как тест-системы для скрининга фармакологических и токсикологических свойств глазных капель различных фармакологических групп (антибиотики, антисептики, анестетики, противовоспалительные препараты, медиаторы, слезозаместители) в целях рационального подбора фармакотерапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ОЦЕНКИ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН У ГРЫЗУНОВ: МЕТОДОЛОГИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Н.А. Александрюшкина¹, В.С. Попов²,
П.И. Макаревич¹

¹ Институт регенеративной медицины, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

e-mail: n.alexandrushkina@gmail.com

Ключевые слова: ранозаживление кожи, модели повреждения кожи *in vivo*, регенеративная медицина

Острые и хронические повреждения кожи, несмотря на очевидный прогресс методов терапии, остаются серьезной проблемой здравоохранения. По оценкам, в мире ежегодно производится более 100 миллионов хирургических разрезов, количество ран травматического происхождения свыше 50 миллионов, причем лечение ожогов и хронических ран, как правило, более длительное и дорогостоящее.

К сожалению, *in vivo* исследования процессов восстановления кожи и образования рубцов до сих пор имеют

ряд существенных ограничений, значительно усложняющих трансляцию полученных результатов в клинику. Основным препятствием в области поиска методов управления ранозаживлением кожи остается использование грызунов в качестве наиболее распространенных экспериментальных моделей. Различия между восстановлением кожи у мышей/крыс и человека, такие как сокращение, вызванное *rapunculatus*, особенно иммунологии, а также, в целом, более успешное заживление в плане исходов, затрудняют оценку результатов и возможных перспектив применения разработок у человека.

Опыт работы коллектива в области терапии повреждений кожи показал, что неотъемлемой частью успешных исследований *in vivo* является включение улучшенных прогностических моделей, которые могут точно предсказать клинический исход. В настоящее время существует множество доклинических моделей как острых ран (продольный разрез кожи, шинированный полнослойный дефект), так и хронических, связанных с ишемией тканей (пролежневый дефект) или диабетическим поражением. Каждая из моделей имеет свои ограничения, что требует четкого понимания происходящих процессов в тканях и возможных исходов при выборе модели *in vivo* для исследований.

Полученные коллективом результаты также подчеркивают насущную необходимость в выборе подходящих и воспроизводимых методов оценки заживления с течением времени как с помощью макроскопических методов (фотосъемка и анализ изображений, шкалы оценки), так и с помощью протоколов морфометрии срезов тканей. Несмотря на устойчивое мнение, что гистология обеспечивает наименее изменчивую оценку заживления, наши данные иллюстрируют необходимость стандартизированных условий и демонстрируют, что гистологическая подготовка серийных срезов крайне эффективна для выявления различий в ходе раневого процесса.

Таким образом, современные представления о выборе лучших *in vivo* моделей повреждения кожи и способах оценки процессов ранозаживления должны помочь исследователям в разработке перспективных методов терапии и повысить вероятность обнаружения новых способов манипулирования процессами регенерации кожи. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ

**А.А. Алексеев^{1,2}, К.А. Филимонов¹,
А.А. Пантелеев², А.А. Бобровников¹**

¹ ФГБУ НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского, Москва, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

e-mail: Doctor-Fil@bk.ru

Ключевые слова: Мезенхимальные клетки, стволовые клетки, регенеративная медицина.

Совершенствование существующих и разработка новых методов хирургического лечения тяжелых ожогов пациентов весьма актуальны. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является

развитие и внедрение в клиническую практику новых биотехнологических методов лечения термических поражений. Несмотря на успешные клинические испытания, внедрение в местное лечение кожных эквивалентов, остается ограниченным.

Одновременно с получением искусственных эквивалентов кожи развивается направление регенеративной медицины, ориентированное на использование стволовых клеток. Способность стволовых клеток дифференцироваться в клетки разных тканевых типов потенциально может помочь как в создании более эффективных кожных эквивалентов, так и в разработке методов стимуляции ростовых процессов в коже *in situ*. Вместе с тем, применение стволовых клеток в клинической практике остается, в большей части, экспериментальным подходом, в силу нестабильности генома этих клеток и сложности контроля их постимплантационной судьбы.

Для лечения термических поражений представляет интерес применение культивированных мезенхимальных стромальных клеток. Результаты исследований показали, что пересадка культивированных МСК больным с глубокими ожоговыми поражениями активизирует процессы новообразования сосудов в ране, ускоряет созревание грануляционной ткани и способствует активной краевой эпителизации, что позволяет оптимизировать подготовку ожоговых ран к ранней аутодермопластике, ускорить разрастание эпидермиса в ячейках и улучшить результаты приживления перфорированных аутодермотрансплантатов.

В настоящее время наиболее перспективным направлением является применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСКЖТ), которые также обладают большим регенераторным потенциалом за счет высокой возможности клеточной дифференцировки и не требуют предварительного культивирования. В зависимости от поставленных целей: лечение донорских ран, пограничных ожогов или глубоких ожогов возможно избирательное применение выделенных МСКЖТ за счет различных вариантов носителей данных клеток: суспензии, гели, обкалывание. Эффективность применения различных форм МСКЖТ при лечении пациентов с термическими поражениями требует дальнейшего изучения и анализа так как показания к данному методу лечения зависят от тяжести травмы, общего состояния пациента и объема оперативного вмешательства.

АДАПТИВНЫЕ НК-КЛЕТКИ ОТЛИЧАЮТСЯ ВЫСОКИМ ПРОЛИФЕРАТИВНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Н.А. Алексеева, С.А. Куст, Е.И. Коваленко

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

e-mail: nadalex@inbox.ru

Ключевые слова: НК-клетки, иммунотерапия, адаптивные НК-клетки, экспансия НК-клеток, NKG2C.

НК-клетки с адаптивными свойствами представляют интерес в контексте их применения в иммунотерапии. Предшественники адаптивных клеток CD57—NKG2C+ отличаются более высоким пролиферативным потенциалом [1]. Для приобретения функциональной активности НК-клетки проходят обучение и начинают экспрессировать на своей поверхности ингибирующие рецепторы KIR [2].

Данная работа выполнялась с целью оценить взаимосвязь между пролиферативным потенциалом NK-клеток CD57⁺ и экспрессией рецепторов KIR2DL2/DL3 и NKG2C при экспансии *in vitro*, а также вклад в экспансию культур низкодифференцированных клеток CD56bright.

NK-клетки выделяли методом негативной магнитной сепарации из мононуклеаров периферической крови. Посредством клеточной сортировки были получены клональные культуры и культуры из 100 клеток субпопуляций, различающихся экспрессией KIR2DL2/DL3 и NKG2C. NK-клетки стимулировали IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 [3,4].

Спустя 10 дней культивирования культур из 100 клеток наблюдалась тенденция к более интенсивной пролиферации в субпопуляции CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺. Культуры различались эффективностью клонообразования. Больше клонов возникало в субпопуляциях CD57⁺KIR⁺, но клоны субпопуляции CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ отличались большим числом клеток. Также было выявлено, что на более поздних стадиях культивирования в пролиферацию более зрелых культур CD57⁺KIR⁺ вносят вклад клетки CD56bright.

Таким образом, пролиферация предшественников адаптивных NK-клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ становится более выраженной на поздних этапах культивирования за счет наращивания клеточной массы редких клонов и вклада в пролиферацию клеток CD56bright. Данная работа поддержана грантом РФФИ № 22-75-00135.

Литература:

1. Kobzyeva P.A., Streltsova M.A., Erokhina S.A. et al. J. Leukoc. Biol. 2020. Т. 108. № 4. С. 1379–1395.
2. Fernandez N.C., Treiner E., Vance R.E. et al. Blood. 2005. Т. 105. № 11. С. 4416–4423.
3. Denman C.J., Senyukov V.V., Somanchi S.S. et al. PLoS One. 2012. Т. 7. № 1.
4. Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kanevsky L.M. et al. Int. J. Mol. Sci. Artic. 2019. Т. 20. С. 443.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ СФЕРОИДОВ

Л.Л. Алексеенко, А.П. Домнина, И.В. Кожухарова, Ю.С. Иванова, Н.А. Пуговкина, О.Г. Люблинская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: al.l@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые/стромальные клетки эндометрия, сфероиды, апоптоз, аутофагия, стресс.

Одним из подходов усиления стрессоустойчивости и терапевтического потенциала трансплантированных мезенхимных стволовых/стромальных клеток (2D-МСК) является формирование трехмерных клеточных сфероидов (3D-МСК). Цель настоящего исследования — масштабный мониторинг изменения профиля экспрессии генов в процессе формирования 3D-МСК из мезенхимных стволовых/стромальных клеток эндометрия человека (3D-эМСК) с использованием количественного ПЦР-анализа. Анализировались группы генов, вовлеченных в процессы мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), ткане-специфической дифференцировки эндометриальных клеток, противовоспалительных процессов,

ответа на стрессовые воздействия, эпигенетических перестроек. При формировании 3D-эМСК обнаружены признаки МЭП-перестройки клеточного фенотипа, активация генов, служащих маркерами децидуальной дифференцировки IGFBP1 и пролактина, а также индукция противовоспалительных генов HGF, TSG, EP2. Исследование 3D-эМСК при помощи проточной цитометрии выявило постепенное снижение жизнеспособности клеток. В подтверждение этого, ПЦР-анализ выявил при формировании сфероидов активацию группы генов, связанных с интегрированным ответом на стресс — адаптивного пути, нацеленного на восстановление клеточного гомеостаза. Интегрированная реакция на стресс при формировании сфероидов может запускаться в клетке под влиянием гипоксии, недостатка аминокислот, глюкозы и т.д. В 3D-эМСК были обнаружены несколько маркеров интегрированного ответа на стресс — усиление ответа на оксидативные повреждения (ERp44, Peroxiredoxin, GPX1, PRDX4, GRx8, TXN2 и SOD1), стресса эндоплазматического ретикулума (DNAJB9, DNAJC10, CNX и HERPUD1), активацию групп генов, связанных с гипоксией (HIF1, VEGF), аутофагией и апоптозом (BECN1, BAX). В поисках молекулярных драйверов наблюдаемых перестроек, мы проанализировали возможность эпигенетических изменений, происходящие при переводе клеток из 2D в 3D-систему культивирования. В процессе формирования 3D-эМСК обнаружено последовательное нарастание экспрессии метилтрансфераз KMT2B, KMT2E и KMT6B, метилирующих гистон H3 по остаткам лизина, что является важной эпигенетической модификацией, вовлеченной в активацию гена НАД-зависимой гистоновой деацетилазы SIRT1 и гена SMARCA1, кодирующего глобальный активатор транскрипции SNF2L1. Уровень экспрессии SIRT1 и SMARCA1 также был увеличен при формировании 3D-эМСК. Полученные данные позволяют нам рассматривать эпигенетическую регуляцию как один из основных молекулярных механизмов, вызывающих резкое изменение профиля экспрессии генов в 3D-эМСК и запускающих программы апоптоза и аутофагии, а также активирующих стресс ответ для восстановления клеточного гомеостаза. Исследование было поддержано грантом РФФИ № 22-74-10126.

ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТРАНСКРИПТОМЕ СЕРДЦА КРЫС ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТИ ЛАКТОЗЫ

О.В. Анацкая¹, А.Л. Рунов², С.В. Пономарцев¹, М.С. Вонский², А.У. Елмуратов³, М.В. Харченко¹, А.Е. Виноградов¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский НИИ Метрологии

им. Д.И. Менделеева, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Ключевые слова: ремоделированы кардиомиоцитов, транскриптомный анализ, полиплоидия, сети межбелковые взаимодействия.

Сердечно-сосудистные заболевания могут возникнуть в результате воспаления задержки роста неонатальном пубертатном периодах [1]. Наиболее частой причиной воспалений задержки роста являются гастроэнтериты разной этиологии, которые, как правило, снижают усвоение лактоз [1, 2]. Мы предположили, что неонатальная непереносимость лактоз (НЛ) сама по себе может провоцировать

долговременные нежелательны изменения сердце. Цель работы было исследовать отложенные эффект неонатальной НЛ на ремоделировании, полиплоидизации транскриптом кардиомиоцитов крыс через 2 месяца после восстановления от 10 дневно НЛ, перенесенной 8–18 дневно возрасте. Морфометрия цитотометрия кардиомиоцитов выявила деформацию клеток их избыточную полиплоидизацию, также признаки повреждения ДН в виде микроряде мостов. Все вместе эти признаки указывают на стресс, генетическую эпигенетическую нестабильность нарушения архитектуры ядерной оболочки клеток [2, 3]. Исследование сети межбелковых взаимодействий для дифференциального экспрессированного гено (ДЭ) анализ генных модулей, обогащенных ДЭ, показали активацию сигнальных каскадов воспаления каскадов реакции на генетическую нестабильность. Также, транскриптомный анализ выявил признаки фетальности сократительном аппарате метаболических процесса, которые сопровождались индукцией пути морфогенез эмбриональность. ранней многоклеточности, что также подтверждает проявление фетальности. Генные модули, снизивши активность после НЛ, относятся, основном, цитокинезу, плазматической мембране клеточно адгезии. Поскольку полиплоидизация сопровождается, потерей цитокинеза снижение относительно площади поверхности мембраны [3–5], можно считать, что ингибированные генные модули служат дополнительным подтверждением избыточной полиплоидизации. Итого, наши результаты показывают, что неонатальная непереносимость лактозы может рассматриваться как важный триггер программирования развития сердечно-сосудистых заболеваний взрослых. Болезнь проявляется через воспаление, повреждение ДН сдвиги равновесия процесса пролиферации дифференцировки. Мы признательны за финансовую поддержку Министерства Наук Высшего образования Российской Федерации, (соглашение No.075-15-2021-1075, подписан 28 сентября 2021).

Литература:

1. Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Beyer T.V., Vinogradov A.E. 2010. V.141. P. 81.
2. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Int J Mol Sci. 2022. V. 23:3542.
3. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Int. J. Mol. Sci. 2022. V 23: 9691.
4. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Mol Biol (Mosk). 2021. V. 55. P. 927–943.
5. Erenpreisa J., Salmina K., Anatskaya O., Cragg M.S. 2022. V. 81.119–131.

ФАНТОМЫ МЯГКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРИЛАМИДА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

К.Г. Антипова, А.Е. Крупнин, Е.А. Храмцова, С.В. Крашенинников, Т.Е. Григорьев

НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: kris444ti@yandex.ru

Ключевые слова: полиакриламид, тканеимитирующие фантомы, гидрогели, модуль Юнга, коэффициент Пуассона, гиперупругость.

Тканеимитирующие фантомы, воспроизводящие свойства отдельных частей человеческого тела, применяются при обучении медицинского персонала и калибровке медицинской техники для ультразвуковой диагностики, КТ, МРТ, ядерной медицины и хирургии. Для

имитации свойств мягких тканей используют гидрогелевые материалы на основе природных и синтетических полимеров, таких как агар, желатин, поливиниловый спирт, полиакриламид и др. Полиакриламид — коммерчески доступный водорастворимый синтетический полимер. Химически сшитые гидрогели на его основе легко получить свободной радикальной полимеризацией. Варьирование концентрации мономера — акриламида — и сшивателя позволяет получать воспроизводимые материалы с широким диапазоном свойств.

Для синтеза материалов использовали методику, описанную в литературе [1]. Степень сшивки гидрогелей на основе акриламида (SigmaAldrich, USA) варьировали, изменяя количество сшивающего агента — N,N'-метиленис-акриламида (SigmaAldrich, USA).

Механические свойства материалов изучали с использованием универсальной разрывной машины Instron 5965 (ITW, США). Испытания проводили в режиме одноосного растяжения с постоянной скоростью деформации 1 мм/мин. Деформационные кривые аппроксимировали моделями гиперупругого материала Нео-Гука, Муни-Ривлина и Гента. Исследование акустических свойств гидрогелей проводили на ультразвуковом микроскопе высокого разрешения SIAM-2011, разработанном в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН с применением методик А-, В- и С-сканирования. Полученные результаты верифицировали в эксперименте на индентирование.

По результатам механических испытаний установлено, что с ростом степени сшивки модуль Юнга гидрогелей изменяется в диапазоне от 20 до 157 кПа, что соответствует аналогичным значениям для нативных мягких тканей [2] Аппроксимация экспериментальных данных моделями гиперупругого поведения позволила оценить модуль сдвига в зависимости от степени сшивки материала. С использованием ультразвуковых исследований проведена оценка коэффициента Пуассона. Экспериментальные данные индентирования гидрогелей соответствуют теоретическим кривым, построенным с учетом результатов механических и ультразвуковых испытаний.

Показано, что механическое поведение гидрогелей на основе полиакриламида сопоставимо с поведением нативных мягких тканей, что позволяет использовать такие системы в качестве тканеимитирующих фантомов.

Работы выполнены в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Muhamad I.I., Asgharzadehahmadi S.A., Zaidel D.N. A. et al. Int. J. Biol. Biomed. 2013. V. 3. P. 108.
2. Handorf, Andrew M., et al. Organogenesis 2013. V. 11.1. P. 1.

ВЛИЯНИЕ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ТРОМБОЦИТОВ НА АКТИВНОСТЬ ОСТЕОГЕНЕЗА И ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРИИМПЛАНТНОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

И.П. Антропова, Е.А. Волокитина, С.М. Кутепов, К.А. Тимофеев

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

e-mail: aip.hemo@mail.ru

Ключевые слова: регенерация, тромбоциты, имплантация, титановый стержень, остеогенез, кролики.

Важнейшими участниками регенерации тканей организма, являются тромбоциты [1]. Активированные тромбоциты контактируют с травмированными тканями и имплантатом, формируют стабильный сгусток, который помимо обеспечения гемостаза, является механической и биохимической матрицей, источником сигнальных молекул и факторов роста [2]. Обосновано применение тромбоцитарных продуктов в ортопедической хирургии, где восстановление плохо васкуляризированной ткани является критическим фактором успешного клинического исхода [3]. Однако результаты лечения неоднозначны [4], что в значительной степени связано с недостаточной изученностью влияния тромбоцитов на репаративный остеогенез.

Ранее ними было определено, что при эндопротезировании тазобедренного сустава активность высвобождения альфа-гранул тромбоцитов пациентов влияет на коагуляционный потенциал крови, скорость формирования сгустка, объем кровопотери. Послеоперационная секреция из альфа-гранул тромбоцитов сохраняется повышенной не менее двух недель после операции и имеет зависимость от своего исходного уровня [5].

В данной экспериментальной работе изучали влияние морфо-функциональных характеристик тромбоцитов на качество периимплантной кости после имплантации титанового стержня в бедренную кость кроликов. Определяли общее количество тромбоцитов, MPV, PDW, PCT, P-LCR, АДФ-агрегацию, уровень маркера остеогенеза остеокальцина до операции, через 1 сутки и 8 недель после операции. Имплантация титанового стержня размерами 0,2×0,6 см. проводилась по принципу press fit. Животные выводились из эксперимента через 8 недель после операции. Проводился гистологический анализ, электронная микроскопия, определение механических свойств периимплантной кости. Проведенные исследования показали, что морфо-функциональный потенциал тромбоцитов влияет на уровень маркера остеогенеза остеокальцина, на прочностные характеристики, но не на эластичность кости. Более высокий тромбоцитарный потенциал сопряжен с более высокой концентрацией кальция и большим значением отношения Ca/P в периимплантной кости. Полученные данные позволяют предположить информативность показателей, отражающих морфо-функциональный статус тромбоцитов, для прогнозирования успешности репаративного процесса в ортопедии, что требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено в рамках государственного задания, регистрационный номер 121031900054-8 от 19.03.2021.

Литература:

1. Cецерска-Нерыц Е., Goszka M., Serwin N., et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2021. S1359.
2. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A. Expert OpinBiolTher. 2016. V.16(2). P.213.
3. Wani T.U., Khan R.S., Rather A.H., et al. Local. J Control Release. 2021. V.10. P. 143.
4. Harrison P. J Thromb Haemost . 2018. V. 9. P. 1895.
5. Антропова И.П., Юшков Б.Г., Кутепов С.М. Казанский медицинский журнал. 2022. Т.103. С.5.

ВЫЯВЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМИ ОТВЕТАМИ НА ПРОФИБРОТИЧЕСКИЕ СТИМУЛЫ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК

**М.С. Арбатский¹, М.А. Виговский^{1,2},
Н.А. Басалова², У.Д. Дьячкова¹,
О.А. Григорьева², А.Ю. 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

e-mail: algenubi81@mail.ru

Ключевые слова: фиброз, мезенхимные стромальные клетки, анализ транскриптома одиночных клеток

Фиброз является одним из ответов тканей на повреждения и во многих случаях приводит к развитию серьезных заболеваний. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) могут как пополнять пул миофибробластов, способствуя прогрессированию фиброза, так и способны подавлять фиброз за счет антифибротического действия секретом. Однако, остается неясным, как реализуется этот выбор в ответ на профибротические стимулы в гетерогенной популяции МСК.

В нашей работе МСК человека культивировали в профибротических условиях и анализировали транскриптом одиночных клеток (10X Genomics). С помощью Cell Ranger [8] были получены данные для дальнейшей обработки. Используя R-пакет Seurat [7], мы проанализировали гены факторов, связанных с фиброзом, по-разному экспрессирующиеся в МСК в профибротических условиях по сравнению со стандартными условиями. Для автоматического типирования клеток мы использовали библиотеки по самым крупным клеточным референсам (BLUEPRINT [1], Human Protein Atlas [2], PanglaoDB [3]), а также пакеты alona [4] (на основе пакета Python — adobo) и SingleR [5] (Bioconductor). По результатам типирования мы выделили клетки с маркерами миофибробластов.

Мы обнаружили, что под влиянием профибротических стимулов часть МСК дифференцируется в миофибробласты, но выделяется субпопуляция, которая достоверно отличается по снижению экспрессии гена гладкомышечного актина (α SMA) — ключевого маркера миофибробластов. Интересно, что среди высокоэкспрессированных генов в α -SMA-субпопуляции представлены факторы, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса (MMP11, CTSK, KLHL24, SH3PXD2B,) а также поддержания стабильности цитоскелета (MARCKSL1) и регуляции ангиогенеза (SERPINF1). Данные RNA-velocity перечисленных генов, полученные с помощью scVelo [6], указывают на то, что повышена не только трансляция указанных выше генов, но и содержание транскрибируемых, процессируемых транскриптов. При построении траектории развития интегрированного объекта с помощью R-пакета dynverse [7] начальная точка находится в кластере, где преимущественно определяются клетки контрольных МСК. После прохождения точки бифуркации в кластере, где расположены клетки с высоким пролиферативным потенциалом, траектории направляются к двум разным кластерам, в одном из которых определяются клетки с маркерами миофибробластов, а в другом — клетки, экспрессирующие гены, ответственные за подавление фибротических изменений. Анализ

экспрессии поверхностных маркеров в выявленных субпопуляциях позволил предложить PDGFRA для их разделения методом проточного сортирования и дальнейшего сравнения функциональных свойств.

Таким образом, в профибротическом микроокружении может реализовываться гетерогенность ответов МСК, в виде как активации дифференцировки определенной субпопуляции МСК в миофибробласты, так и образования субпопуляции с предположительно выраженными антифибротическими свойствами.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-75-30007).

Литература:

1. Martens J.H., Stunnenberg H.G. *Haematologica*. 2013 Oct;98(10):1487–9.
2. Karlsson M. et al. *Science Advances*. — 2021. — Т. 7. — №. 31. — С. eabh2169.
3. Franzén O., Gan L.M., Björkegren J.L.M. *Panglao Database*. — 2019. — Т. 2019.
4. Franzén O., Björkegren J.L.M. *Bioinformatics*. — 2020. — Т. 36. — №. 12. — С. 3910–3912.
5. Aran D, Looney AP, Liu L et al. 2019. *Nat. Immunol.*, 20, 163–172.
6. La Manno G. et al. *Nature*. — 2018. — Т. 560. — №. 7719. — С. 494–498.
7. Hao Y. et al. *Cell*. — 2021. — Т. 184. — №. 13. — С. 3573–3587. e29.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ В АНАЛИЗЕ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМА ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК

М.С. Арбатский¹, А.Ю. 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

e-mail: algenubi81@mail.ru

Ключевые слова: машинное обучение, нейронные сети, анализ транскриптома одиночных клеток, системная биология.

Внедрение методов секвенирования транскриптома одиночных клеток (scRNA-seq) одновременно расширило возможности для научных исследований, но также увеличило количество вычислительных задач. Сразу после начала использования первых программных продуктов для анализа данных scRNA-seq появились многочисленные публикации, посвященные выявлению новых типов клеток и неизвестных до сих пор субпопуляций.

В стандартном пайплайне анализа данных scRNA-seq выделяют несколько следующих друг за другом этапов обработки данных: выравнивание транскриптов на геном, препроцессинг, включающий контроль качества и удаление низкокачественных клеток, нормализацию, снижение размерности, кластеризацию, типирование (идентификацию) клеток, визуализацию и функциональный анализ. Однако, результаты, получаемые на этапе кластеризации и типирования клеток, не являются исчерпывающими. Так, количество, размер и взаиморасположение кластеров зависит от применяемых в стандартных пайплайнах алгоритмах. Например, в широкоизвестном программном пайплайне Cell Ranger используются метод k-средних и графовая кластеризация [1]. Применяемые

методы автоматического типирования клеток основаны на трансфере вручную заранее определенных меток с референсных датасетов на анализируемые.

В связи с бурным развитием методов машинного обучения и применением нейронных сетей в анализе данных scRNA-seq появились принципиально новые возможности в этих двух задачах. В случае получения неудовлетворительного результата кластеризации, исследователю приходится вносить изменения в пространство признаков для корректировки результата. Зачастую эта связь не прозрачна, что приводит к большому числу итераций. Так, для кластеризации используется R-пакет на базе нейронных сетей scDeepCluster [2], позволяющий итеративно учитывать обратную связь без корректировки пространства признаков.

Для типирования клеток используется scCapsNet (CapsNet) [3]. Модель scCapsNet обеспечивает вклад каждого извлеченного признака в распознавание типа клеток. Кроме того, смешивание данных об экспрессии РНК двух клеток разных клеточных типов с последующим использованием модели scCapsNet, обученной на несмешанных данных, может прогнозировать типы клеток в смеси клеток с высокой точностью.

Особый интерес представляет использование нейронных сетей с архитектурой автоэнкодеров, которые позволяют избавляться от batch-эффекта, связанного с использованием разных платформ для секвенирования, процедурами получения и подготовки образца, а также алгоритмами обработки данных [4].

Результаты анализа данных scRNA-seq также могут быть применены в моделировании клеточного состава тканей, органов и систем органов. Так, например, используя уникальные данные при исследовании тканей на уровне одиночных клеток, с помощью платформы BioUMI [5] были разработаны математические модели клеток поперечно-полосатой мышечной ткани и сердечно-сосудистой системы. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-75-30007).

Литература:

1. Blondel V.D. et al. *Journal of statistical mechanics: theory and experiment*. — 2008. — Т. 2008. — №. 10. — С. P10008.
2. Tian T. et al. *Nature Machine Intelligence*. — 2019. — Т. 1. — №. 4. — С. 191–198.
3. Wang L. et al. *Nature Machine Intelligence*. — 2020. — Т. 2. — №. 11. — С. 693–703.
4. Russkikh N. et al. *Bioinformatics*. — 2020. — Т. 36. — №. 20. — С. 5076–5085.
5. Kolpakov F. et al. *Nucleic Acids Research*. — 2022.

ОЦЕНКА АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАРНЫМИ ФАКТОРАМИ РОСТА, ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ В КОРРЕКЦИИ БОЛЕЗНИ ПЕЙРОНИ

С.А. Артеменко¹, М.В. Епифанова¹, А.А. Костин¹, Е.В. Гамеева¹, Б.Р. Гвасалия², А.А. Епифанов³

¹ Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

² ФГБОУ ВО МГУ пищевых производств, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: epifanova_maya@mail.ru

Ключевые слова: аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста (АОТ), экстракорпоральная ударно-волновая терапия (ЭУВТ), болезнь Пейрони (БП).

Цель исследования — это оценка эффективности аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста (АОТ), в комбинации с экстракорпоральной ударно-волновой терапией (ЭУВТ), а также монотерапии ЭУВТ в лечении болезни Лейрона (БП) (патент на изобретение РФ № 2741196).

40 мужчин с БП случайно были разделены на 2 группы. В 1 группе выполнено лечение с помощью ЭУВТ (Dornier Aries) на половой член (ПЧ), зону фиброза, кальцинаты ($n=20$) дважды в неделю на протяжении 6 недель, возраст 47 лет (21–71), продолжительность БП 1,5 года (0,5–5). Группа 2 ($n=20$) получала 2 сеанса терапии в неделю в течение 6 недель. 1 сеанс включал ЭУВТ на ПЧ, зону фиброза, кальцинаты и инъекции АОТ в ПЧ, зону фиброза, кальцинаты, в конце АОТ активировали при помощи ЭУВТ. 2 сеанс включал в себя ЭУВТ на ПЧ, зону фиброза, кальцинаты, возраст 46 лет (29–71), продолжительность БП 1,75 лет (0,5–4). Результаты оценивали на 0 и 60 дни исследования: PDQ, ВАШ при эрекции и при половом контакте, УЗИ ПЧ, угол искривления ПЧ (медиана (IQR)%).

Лечение всеми пациентами переносилось удовлетворительно. Далее представлены результаты в 1 группе. ВАШ при эрекции с 1,5 (0–2) уменьшилась до 0 баллов (0–0) ($p<0,05$). ВАШ при половом контакте с 1 балла (0–2,5) уменьшилась до 0 баллов (0–1) ($p=0,02$). PDQ с 9,5 баллов (6,5–14) уменьшился до 3 баллов (0,5–4,5) ($p<0,05$). Угол искривления ПЧ с $26,7^\circ$ (19–37) уменьшился до $18,7^\circ$ (13,5–23,9) ($p=0,02$). У 1 пациента кальцинат исчез, у 1 фиброз заместился кальцином, у 4 уменьшилось количество, у 1 количество не изменилось. Размер кальцинатов с 3,5 мм (2,2–7,2) уменьшился до 1,3 мм (1–4,6) ($p=0,05$). Фиброз с $207,4 \text{ мм}^2$ (136–350) уменьшился до 76 мм^2 (47,5–132) ($p<0,05$). Далее представлены результаты в 2 группе. ВАШ при эрекции с 3 баллов (2–4) уменьшилась до 0 баллов (0–1,5) ($p<0,05$). ВАШ при половом контакте с 3 баллов (2,5–4,5) уменьшилась до 0 баллов (0–1) ($p<0,05$). PDQ с 12 баллов (9–15,5) уменьшился до 6 баллов (2–8,5) ($p<0,05$). Угол искривления ПЧ с $27,5^\circ$ (20–38) уменьшился до 15° (8,5–23,5) ($p<0,05$). У 5 пациентов уменьшилось количество кальцинатов, у 2 появились, у 1 не изменилось, у 1 стали фрагментированные, у 3 пациентов фиброз исчез полностью. Размер кальцинатов изменился с 3 мм (2,7–6) до 3 мм (2–4,7) ($p=0,5$). Фиброз с $96,7 \text{ мм}^2$ (65,8–183,6) уменьшился до $42,9 \text{ мм}^2$ (22,8–61,7) ($p<0,05$). Через 60 дней после лечения межгрупповой анализ демонстрирует значимое уменьшение площади фиброза ПЧ и выраженность болевого синдрома по данным ВАШ в группе где применялась АОТ в комбинации с ЭУВТ ($p<0,05$).

Монотерапия ЭУВТ и комбинированная терапия АОТ с ЭУВТ являются эффективными консервативными методами лечения БП. Комбинированное лечение более эффективно в отношении коррекции фиброза ПЧ и болевого синдрома при БП.

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЛОКНИСТОГО КОМПОНЕНТА ГЕМАТОТЕСТИКУЛЯРНОГО БАРЬЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОЧНОЙ И УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕОБСТРУКТИВНОЙ АЗООСПЕРМИЕЙ

**С.А. Артеменко¹, М.В. Епифанова¹, А.А. Костин¹,
Г.А. Демьякин², Е.В. Гамеева¹, А.А. Епифанов³**

¹ *Российский университет дружбы народов (РУДН),
Москва, Россия*

² *ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России,
Обнинск, Россия*

³ *ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава
России, Москва, Россия*

e-mail: epifanova_maya@mail.ru

Ключевые слова: аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста (АОТ), экстракорпоральная ударно-волновая терапия (ЭУВТ), мужское бесплодие, азооспермия.

Цель текущего исследования — это иммуногистохимическая (ИГХ) оценка коллагенов при лечении пациентов с необструктивной азооспермией аутоплазмой, обогащенной тромбоцитарными факторами роста (АОТ), в комбинации с экстракорпоральной ударно-волновой терапией (ЭУВТ) (патент на изобретение РФ № 2738543).

Исследовался биопсийный материал фрагментов яичек 14 пациентов с секреторной формой азооспермии, средний возраст пациентов $33,07 \pm 4,64$ лет. Лечение включало 2 визита в неделю, на протяжении 6 недель: 1 визит — инъекции АОТ в яичко, семенной канатик под УЗ-контролем с последующей активацией ее с помощью ЭУВТ (Dornier Aries); 2 сеанс — ЭУВТ на яички. Биопсийный материал после TESE оценивали ИГХ методом (антитела к коллагену I, III и IV типа) до начала терапии и через 180 дней после последней инъекции АОТ.

До лечения получены следующие результаты: коллаген I типа — 2 балла ($22,1 \pm 1,7\%$, $p<0,05$), коллаген III типа — 3 балла ($44,5 \pm 0,3\%$, $p<0,05$), коллаген IV типа — 2 балла ($21,4 \pm 1,5\%$, $p<0,05$). После лечения: коллаген I типа — 3 балла ($54,2 \pm 2,4\%$, $p<0,05$), коллаген III типа — 2 балла ($27,5 \pm 0,7\%$, $p<0,05$), коллаген IV типа — 3 балла ($52,2 \pm 2,6\%$, $p<0,05$). Соотношение коллагенов I-го и III-го типов составило 0,5, а после применения АОТ с ЭУВТ — 2,0, что указывает на активацию пластических процессов волокнистого компонента в яичке на фоне проводимого лечения. Отмечалась положительная динамика при ИГХ-реакциях на антитела к Coll. IV в базальной мембране стенки извитых семенных канальцев, а также в субэндотелии кровеносных сосудов. Обнаружено увеличение интенсивности окрашивания указываемого белка после терапии в 2,0–2,5 раза, что указывает на улучшение регенерации и восстановления волокнистого компонента гемато-тестикулярного барьера и проницаемости для биологически активных веществ интерстициальной ткани, что в результате улучшает сперматогенез.

Продукция биологически активных веществ на фоне комбинированной терапии АОТ+ЭУВТ стимулирует синтез разных типов коллагена, способствуя восстановлению волокнистого компонента гемато-тестикулярного барьера и улучшению сперматогенеза.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАРНЫМИ ФАКТОРАМИ РОСТА, И УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ НЕОБСТРУКТИВНОЙ АЗОСПЕРМИИ

С.А. Артеменко¹, М.В. Епифанова¹, А.А. Костин¹,
Г.А. Демяшкин², Е.В. Гамеева¹, А.А. Епифанов³

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

³ ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: epifanova_maya@mail.ru

Ключевые слова: аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста (АОТ), экстракорпоральная ударно-волновая терапия (ЭУВТ), мужское бесплодие, азооспермия.

Цель исследования — оценить эффективность аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста (АОТ), в комбинации с экстракорпоральной ударно-волновой терапией (ЭУВТ) в лечении мужского бесплодия, а именно необструктивной азооспермии (патент на изобретение РФ № 2738543).

14 пациентов разделены на 2 группы: 1 группа с нормальным базовым уровнем ФСГ ($n=5$), медиана возраста 31 год (28–43); 2 группа с высоким базовым уровнем ФСГ ($n=9$), медиана возраста 33 года (28–40). Лечение включало 2 сеанса в неделю, на протяжении 6 недель: 1 сеанс — инъекции АОТ в яичко, семенной канатик под УЗ-контролем с последующей активацией ее с помощью ЭУВТ (Dornier Aries); 2 сеанс — ЭУВТ на яички. Оценка результатов лечения на 0 и 90 день после последней инъекции: гормональный профиль, спермограмма, УЗИ органов мошонки, а через 180 дней после последней инъекции АОТ — повторная биопсия яичка (TESE).

Побочных эффектов зафиксировано не было, терапия всеми пациентами переносилась удовлетворительно. Медиана общего тестостерона крови в 1 группе уменьшилась с 13,9 нмоль/л до 12,6 нмоль/л ($p>0,05$), в 2 группе увеличилась с 12,8 нмоль/л до 16,0 нмоль/л ($p>0,05$). Значимо изменился уровень ФСГ: в группе 1 с 6,5 мМЕд/мл увеличился до 7,7 мМЕд/мл ($p<0,001$); в группе 2 с 15,7 уменьшился до 14,8 ($p<0,001$). Уровень ЛГ в 1 группе с 4,7 мМЕд/мл увеличился до 5,1 мМЕд/мл ($p=0,025$). В 2 группе уровень ЛГ не изменился — 7,8 мМЕд/мл ($p>0,05$). На основании проведенного анализа биоптатов яичек у большинства пациентов ($n=11$) отмечается средняя ($n=9$; 64%) и высокая ($n=3$; 21%) положительная динамика, у 2 мужчин (14%) изменений не выявлено. У 7 (50%) пациентов отмечено появление мужских гамет более «продвинутых» стадий сперматогенеза после проведенного лечения в отличие от результатов при первичной биопсии, где присутствовали лишь сперматогонии. Кроме того, у одного пациента, у которого изначально выявили субтотальную аплазию мужских половых клеток, после терапии обнаружили сперматозоиды. Медиана JS до 2 балла (1–6), после 4 (2–7) в 1 группе ($p=0,0046$); в группе 2 — до 2 (1–6) и после лечения 4 (1–8) ($p=0,0204$). Клетки Лейдига до лечения 2 (2–3) после — 4 (3–5) в 1 группе ($p=0,0349$), в 2 группе с 2 (1–2) увеличился до 5 (1–5) ($p=0,0147$). Также увеличилась степень васкуляризации ($p<0,05$) и количество стромального компонента в яичках у мужчин в обеих группах. Итог контрольной TESE: в 1 группе в 1 случае (20%) обнаружены сперматозоиды,

в 2 группе — в 4 случаях (44,4%) обнаружены сперматозоиды. В 2 группе наступило 3 беременности с помощью ВРТ.

Отмечено регулирующее влияние АОТ и ЭУВТ на уровень ФСГ, ЛГ, тестостерон, уменьшение ОС, улучшение трофики тестикулярной ткани, индукция механизма репарации внеклеточного матрикса.

АУТОПЛАЗМА, ОБОГАЩЕННАЯ ТРОМБОЦИТАРНЫМИ ФАКТОРАМИ РОСТА, И ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНАЯ УДАРНО-ВОЛНОВАЯ ТЕРАПИЯ В КОРРЕКЦИИ ЭРЕКТИЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

С.А. Артеменко¹, М.В. Епифанова¹, А.А. Костин¹,
Е.В. Гамеева¹, Б.Р. Гвасалия², А.А. Епифанов³

¹ Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

² ФГБОУ ВО МГУ пищевых производств, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: epifanova_maya@mail.ru

Ключевые слова: аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста (АОТ), экстракорпоральная ударно-волновая терапия (ЭУВТ), эректильная дисфункция (ЭД).

Цель исследования — оценка эффективности аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста (АОТ), и экстракорпоральной ударно-волновой терапии (ЭУВТ) в лечении эректильной дисфункции (ЭД) васкулогенного генеза.

100 мужчин случайно распределили на 3 группы. В 1 группе ($n=20$) возраст 43,5 года (20–60), длительность ЭД 3 года (0,5–12), терапия включала в себя ЭУВТ на половой член (ПЧ) (Dornier Aries) дважды в неделю на протяжении 6 недель. Группа 2 ($n=40$) — возраст 43 года (19–71), длительность ЭД 3 года (0,5–15); группа 3 ($n=40$) — возраст 48 лет (21–71), длительность ЭД 2,25 года (0,5–6). Пациенты 2 группы осуществляли 2 визита в неделю на протяжении 6 недель — в 1 визит выполняли ЭУВТ на ПЧ и инъекции АОТ в ПЧ, в конце сеанса активировали АОТ с помощью ЭУВТ, во 2 визит — ЭУВТ на ПЧ. В 3 группе терапия включала 2 визита в неделю на протяжении 6 недель. В 1 визит выполняли ЭУВТ на ПЧ и инъекции АОТ в половой член, активированную 10% раствором CaCl_2 , во 2 визит — ЭУВТ на ПЧ. Обследование всех пациентов проводилось на 0 и 60 дни исследования (медиана (IQR%): МИЭФ-5, профиль половых отношение (ППО), шкала твердости эрекции (ШТЭ), GAG, общий тестостерон крови, ФДГ сосудов ПЧ с аналогом ПГЕ1).

В 1 группе МИЭФ-5 с 14,5 баллов (10,5–17) увеличился до 19,5 баллов (15,5–21) ($p<0,05$). ППО увеличился с 2 баллов (1–2) до 3 баллов (2–4) ($p<0,05$). ШТЭ возросла с 1,5 баллов (1–2) до 3 баллов (2,5–3) ($p<0,05$). По данным ФДГ PSV с 16,3 см/с (12,2–22,7) увеличилась до 24 см/с (19,4–26,8) ($p<0,05$). RI с 0,7 (0,7–0,9) увеличился до 0,9 (0,8–1) ($p<0,05$). По GAG 14 пациентов (70 %) отметили положительный эффект от лечения. Общий уровень тестостерона увеличился с 13,6 нмоль/л (9,3–16,6) до 14,4 нмоль/л (10,9–18,5) ($p=0,31$). В 2 группе МИЭФ-5 с 13 баллов (11–15) увеличился до 18 баллов (16–20) ($p<0,05$). ППО с 2 баллов (1,5–2) возрос до 3 баллов (3–4) ($p<0,05$). ШТЭ изменилась с 2 баллов (1–2) до 3 баллов

(2–3) ($p < 0,05$). PSV с 15,6 см/с (12,1–22,8) увеличилась до 27 см/с (20,6–33,5) ($p < 0,05$). RI с 0,8 (0,7–1) возрос до 1 (0,8–1) ($p = 0,02$). По GAQ 34 пациента (85%) отметили положительный эффект от лечения. Общий тестостерон крови возрос с 14,9 нмоль/л (9,9–20,7) до 16,4 нмоль/л (11,9–20,8) ($p = 0,4$). В 3 группе МИЭФ-5 с 13 баллов (9–15) возрос до 18,5 баллов (15–20,5) ($p < 0,05$). ППО с 2 баллов (1–2) увеличился до 3 баллов (3–4) ($p < 0,05$). ШТЭ с 1 балла (1–2) до 3 баллов (3–3) ($p < 0,05$). PSV с 17 см/с (10,3–25) увеличилась до 27,8 см/с (20–36,6) ($p < 0,05$). RI с 0,8 (0,7–0,9) увеличился до 0,9 (0,8–1) ($p < 0,05$). Общий тестостерон крови возрос с 14,9 нмоль/л (10,8–21) до 17,1 нмоль/л (14–22,6) ($p = 0,14$). По GAQ 33 пациента (82,5 %) отметили положительный эффект от лечения.

Терапия всеми пациентами переносилась удовлетворительно. Отмечается положительная динамика в отношении улучшения эректильной функции у всех пациентов. При сравнении групп комбинированная терапия АОТ+ЭУВТ значительно повышает эректильную функцию согласно ППО, ШТЭ и ФДГ сосудов ПЧ.

ТЕРАПИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ С ПОМОЩЬЮ АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАРНЫМИ ФАКТОРАМИ РОСТА, И УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ

**С.А. Артеменко¹, М.В. Епифанова¹,
А.А. Костин¹, Е.В. Гамеева¹, А.А. Епифанов²**

¹ *Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

² *ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия*

e-mail: epifanova_maya@mail.ru

Ключевые слова: аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста (АОТ), экстракорпоральная ударно-волновая терапия (ЭУВТ), мужское бесплодие.

Цель исследования — оценить эффективность и безопасность применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста (АОТ), в комбинации с экстракорпоральной ударно-волновой терапией (ЭУВТ) в лечении мужского бесплодия (патент на изобретение РФ № 2738543).

30 пациентов разделены на 2 группы: 1 группа с нормальным базовым уровнем ФСГ ($n = 23$), медиана возраста 34 года (24–65); 2 группа с высоким базовым уровнем ФСГ ($n = 7$), медиана возраста 40 лет (29–62). Лечение включало 2 сеанса в неделю на протяжении 6 недель: 1 сеанс — ЭУВТ (Dornier Aries) на яички, инъекции АОТ в яички, семенные канатики под УЗ-контролем с последующей активацией ее с помощью ЭУВТ; 2 сеанс — ЭУВТ на яички. Оценка результатов на 0 и 130 день исследования: гормональный профиль, спермограмма, фрагментация ДНК сперматозоидов, концентрация АФК в нативном эякуляте, УЗИ органов мошонки (среднее [СI95%]).

В группе 1 отмечено увеличение ФСГ с 5,0 мМЕд/мл (4,1–5,9) до 5,9 мМЕд/мл (4,9–6,9) ($p < 0,05$). В группе 2 уменьшение ФСГ с 17,3 мМЕд/мл (10,9–23,7) до 13,6 мМЕд/мл (8,3–18,9) ($p = 0,14$). В 1 группе общий тестостерон с 14,7 нмоль/л (12,7–16,6) увеличился до 16,9 нмоль/л (14,9–18,8) ($p = 0,0070$); во второй группе общий тестостерон крови базово 13,5 нмоль/л (10,3–16,5), после лечения — 19,9 нмоль/л (9,3–30,4) ($p = 0,2$). В группе 1 число сперматозоидов увеличилось с 51,7 млн/мл (32,9–70,4) до 66,6 млн/мл (41,3–91,7)

($p = 0,1$); в группе 2 число сперматозоидов увеличилось с 40,1 млн/мл (7,7–72,6) до 56,3 млн/мл (23,8–88,7) ($p = 0,1$). В 1 группе процент сперматозоидов с нормальной морфологией увеличился с 9,3% (3,3–15,5) до 11,8% (5,4–18,1) ($p = 0,5$). В 2 группе изменения минимальны, до лечения — 14,4% (10,1–39), после — 14,7% (8,5–37,9) ($p = 0,9$). В группе 1 процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов увеличился с 32,6% (24,8–40,4) до 41,3% (33,8–48,8) ($p = 0,04$); в группе 2 с 36,8% (13,5–60,0) до 47,0% (32,0–61,9) ($p = 0,1$). Статистически значимо увеличился в 1 группе процент жизнеспособных сперматозоидов с 65,6% (57,8–73,4) до 71,3% (66,2–76,5) ($p = 0,0074$). Во второй группе также отмечен прирост процента жизнеспособных сперматозоидов с 69,1% (60,5–77,7) до 73,8% (64,4–83,3) ($p = 0,0914$). Процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК в 1 группе уменьшился с 25,3% (19,8–30,8) до 15,9% (10,6–21,2) ($p = 0,0008$); в группе 2 с 15,6% (7,9–23,3) до 11,4% (6,3–16,5) ($p = 0,06$). В первой группе до лечения концентрация АФК составила 6,7 СРМх10⁵ (2,5–10,9), после — 3,3 СРМх10⁵ (1,4–5,2) ($p = 0,01$); в группе 2 концентрация АФК снизилась с 3,6 СРМх10⁵ (2,0–5,0) до 2,0 СРМх10⁵ (1,3–2,6) ($p = 0,01$). Объем эякулята значимо не изменился во всех группах. В результате: в 1 группе наступило 14 беременностей, в 2 группе — 4 беременности.

Отмечено влияние АОТ в комбинации с ЭУВТ на уровень ФСГ, тестостерона, уменьшение ОС в сперме, улучшение всех показателей спермы, кроме объема эякулята, и, как результат, наступление 18 беременностей из 30 случаев.

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ПОКРЫТИЯ ДЛЯ КОРОНАРНЫХ СТЕНТОВ, СОСТОЯЩЕЕ ИЗ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ СТРУКТУРУ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА EX VIVO С ЦЕЛЬЮ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РЕСТЕНОЗИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

**Ш.Д. Ахмедов¹, С.А. Афанасьев¹, И.В. Степанов¹,
М.Е. Трусова², С.И. Твердохлебов², Б.Н. Козлов¹**

¹ *НИИ кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра, Томск, Россия*

² *Томский политехнический университет, Томск, Россия*

e-mail: Shamil@cardio-tomsk.ru

Ключевые слова: атеросклероз, атеросклеротическая бляшка, наночастицы, химически модифицированные наноконпозиты, коронарный стент.

Проблема возникновения рестенозирования коронарных стентов у пациентов, которым в качестве лечения ИБС было произведено стентирование коронарных артерий, очень хорошо известна в кардиологической практике. Повторное стенозирование всегда сопровождается высокими рисками возвратной стенокардии, инфарктами миокарда и внезапной сердечной смертью. С целью возможного влияния на процесс роста атеросклеротических бляшек (АБ) на клеточном и молекулярном уровнях, решено было использовать наноматериалы ноль валентного железа размерами от 30 до 100 нм [1], покрытые углеродным слоем 5 нм. После химической

модификации углеродного слоя солями арилдиазония, полученные наноконкомпозиты (НК) приобретают свойства активного взаимодействия с липидами и со структурой атеросклеротической бляшки человека [2, 3]. На морфологическом уровне, а также с помощью двулучевого спектрометра Spexord 250 Plus исследованы механизмы взаимодействия НК с АБ (n=30), которые брались во время плановых операций каротидной эндартерэктомии. Доказательная база взаимодействия наноконкомпозитов с АБ выстраивалась с помощью разработанных в проекте моделей *in vitro* и применяемых в эксперименте на лабораторных животных *in vivo* [4,5]. Разработан прототип нового поколения коронарного стента в основе которого лежит металлический стент Sinus (компания «Ангиолайн»). Его рабочая поверхность покрывается биоразлагаемым покрытием, в состав которого входят НК, которые при контакте с париетальной атеросклеротической сосудистой бляшкой, позволяют изменять её структуру с вероятным механизмом отрицательного влияния на её последующий рост.

Литература:

1. Ermakov, A.E.; Uimin, M.A.; Lokteva, et al. Russ. J. Phys. Chem. A 2009, 83, 1187–1193.
2. Postnikov, P.S.; Trusova, M.E.; Fedushchak, et al. Nanotechnol. Russ. 2010, 5, 446–449.
3. Akhmedov, S.D.; Afanasiev, S.A.; Filimonov, et al. Agent for Selective Adjustment of Blood Lipids. U.S. Patent US9,789,134,B2, 17 October 2017.
4. Akhmedov, S.; Afanasyev, S.; Trusova, M. et al. Biomedicines 2021, 9, 802. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070802>
5. Akhmedov, S.; Afanasyev, S.; Beshchasna, N.; et al. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 8241. <https://doi.org/10.3390/ijms23158241>

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ НА МОДЕЛИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ *IN VITRO*

**Э.Р. Ахметзянова, А.В. Тимофеева,
М.Н. Журавлева, Я.О. Мухамедшина**

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: elyaelya18@gmail.com

Ключевые слова: клетки микроглии, травма спинного мозга, поляризация клеток.

Травма спинного мозга (ТСМ) характеризуется многочисленными патологическими реакциями, в которые вовлечены все типы клеток центральной нервной системы. Одним из важных звеньев посттравматических реакций является активация клеток микроглии, которые первыми реагируют на повреждения нервной ткани. Фактически, активированная микроглия способна синтезировать не только трофические биомолекулы, такие как нейротрофины, глутаматные транспортеры и антиоксиданты, но также и эфферторы, которые могут быть потенциально нейротоксичными, такие как оксид азота (NO) и провоспалительные цитокины. Из-за этой двойственной природы, роль, которую играет микроглия в регулировании нейрорегенерации в различные периоды посттравматического процесса, остается спорной. Целью исследования было выявление изменений в фенотипе клеток микроглии (M1 провоспалительный/M2 противовоспалительный) в зависимости от тяжести травмы спинного мозга.

Всем экспериментальным животным наносили дозированную контузионную травму спинного мозга на уровне Th8 разной степени тяжести при помощи импактора Leica Impact One Stereotaxic Impactor for Reproducible Neurotrauma, моделирующего разные степени повреждения: слабую (1,5 м/с), среднюю (2,5 м/с) и тяжелую (4 м/с). Полученные из головного мозга новорожденных крысят клетки микроглии культивировали до прикрепления к культуральному пластику. Для моделирования ТСМ *in vitro* клетки микроглии культивировали с добавлением гомогенатов ткани, полученных из спинного мозга травмированных животных. Через 72 часа культивирования клетки забирались для анализа ПЦР-РВ и для проточной цитометрии.

Методом проточной цитометрии выявлены изменения в фенотипе микроглии, культивированной при разных условиях, в частности, количество микроглии с провоспалительным фенотипом возрастало преимущественно на модели травмы средней степени тяжести. Анализ ПЦР-РВ также выявил изменения в экспрессии генов в микроглии, культивированной при разных условиях.

СКАНИРУЮЩАЯ КАПИЛЛЯРНАЯ МИКРОСКОПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

**А.И. Ахметова¹, Т.О. Советников²,
М.А. Тихомирова¹, И.В. 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. Ломоносов, Москва, Россия

e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

Ключевые слова: опухолевые клетки, сканирующая капиллярная микроскопия, цисплатин, нокодазол.

Капиллярная микроскопия позволяет оценивать физико-химические и биомеханические изменения в опухолевых клетках под воздействием цитотоксических средств, в частности, цисплатина и нокодазола.

Отличительная особенность капиллярной микроскопии от других методов исследования — возможность определять биомеханические свойства живой клетки и отслеживать в режиме реального времени процессы жизнедеятельности клетки под воздействием цитотоксических веществ. В данной работе с помощью капиллярной микроскопии оценивалось изменение шероховатости опухолевых клеток после воздействия цисплатина и нокодазола. Оценка шероховатости проводилась в ПО FemtoScan Онлайн посредством вычитания грубого рельефа с помощью сплайна и параболы. После обработки статистических данных было показано, что наибольшее изменение шероховатости на поверхности опухолевых клеток было вызвано воздействием нокодазола [1, 2]. Шероховатость контрольного образца по параметрам Ra и Rq соответственно составила $35 \pm 5 / 48 \pm 6$ нм при вычитании сплайном, $33 \pm 5 / 45 \pm 6$ нм при вычитании параболой. Под воздействием цисплатина шероховатость практически не изменяется. Под воздействием нокодазола значение шероховатости увеличивается и составляет $51 \pm 5 / 68 \pm 6$ нм и $56 \pm 6 / 72 \pm 7$ нм. Значение t-критерия Стьюдента для

средних значений по выборкам контроля и образца, обработанного нокадозолом, составляет 3,04/2,55 (Ra/Rq, при вычитании сплайна) и 2,97/2,99 (Ra/Rq при вычитании параболы) при табличном значении $t = 2,20$, откуда можно сделать вывод о наличии статистически значимых различий между значениями шероховатости.

Сканирующая капиллярная микроскопия может быть перспективным методом для оценки чувствительности биопсионного материала к определенным препаратам и веществам, для оценки биомеханического и физико-химического воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества (проект № 21-58-10005), РФФИ, проект № 20-32-90036, Фонда содействия инноваций (проект № 71108).

Литература:

1. Советников Т.О., Тихомирова М.А., Ахметова А.И., Яминский И.В. Наблюдение клеток карциномы человека в капиллярном микроскопе. *Медицина и высокие технологии*. 2022. № 2, С. 10.
2. Яминский И.В., Ахметова А.И., Советников Т.О., Тихомирова М.А., Янг Ш. Сканирующая капиллярная микроскопия: визуализация опухолевых клеток. *Наноиндустрия*. 2022. Т.15. № 3–4. С. 168.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ

С.А. Базанович¹, М.А. Звягинцева¹, Я.В. Морозова¹, С.М. Радаев², В.А. Смирнов², А.А. Гринь², С.И. Рябов¹

¹ ФГБУ Научный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

e-mail: Bazarus13.ukr@yandex.ru

Ключевые слова: травма спинного мозга, клеточная терапия, мононуклеарные клетки пуповинной крови человека.

Цель исследования — оценка эффективности внутривенного введения криоконсервированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПКЧ) в остром периоде контузионной травмы спинного мозга у крыс на восстановление двигательной активности конечностей и формирование посттравматических кист [1].

Исследование выполнено на взрослых крысах-самках линии Спрег-Дуоли. Тяжелую контузионную травму спинного мозга моделировали по методу «weight-drop». Использовали крио-консервированный концентрат МКПКЧ, хранившийся 3–4 года при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2]. Двигательную функцию конечностей исследовали в открытом поле, с оценкой опорно-двигательного аппарата по шкале BBB для крыс [3]. А также в плавающим тесте, с применением нового метода оценки движения задних конечностей, с использованием параметров дисперсии величин суставных углов [4], МРТ-сканирование проводили с применением МРТ высокого поля Clin Scan 7.0 T томография (Bruker BioSpin, Германия) [5].

Однократное внутривенное введение МКПКЧ в количестве 10 млн клеток в первые сутки после тяжелой контузионной травмы спинного мозга достоверно улучшает ($p < 0,05$) восстановление двигательной функции задних конечностей (на 40–50 %) относительно уровня группы «самовосстановления» у крыс. Объем образующихся на 4–5 сутки посттравматических кистозных полостей достоверно ($p < 0,05$) уменьшается в два раза после клеточной терапии.

Проведенное исследование показывает, что криоконсервированные МКПКЧ могут быть использованы, как эффективное средство клеточной терапии в остром периоде контузионной травмы спинного мозга.

Литература:

1. Архадов Т.А. и др. Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях 2-е издание. Под ред. М.А. Пальцева, В.Н. Смирнова. Москва 2012. 176 с.
2. Рябов С.И., Звягинцева М.А., Смирнов В.А. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157. № 1. С. 98.
3. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. J. Neurotrauma. 1995.V.12. N 1. P. 1.
4. Bazanovich S.A. et al. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2022. — Т. 172. — №. 4. — С. 499–503.
5. Ядгаров М.Я., Смирнов В.А., Базанович С.А. и др. Нейрохирургия. 2022. Т24. № 1. С.38.

ТЕРАПИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ: ЭКСПЕРИМЕНТ И КЛИНИКА

С.А. Базанович¹, М.А. Звягинцева¹, Я.В. Морозова¹, С.М. Радаев², В.А. Смирнов², А.А. Гринь², С.И. Рябов¹

¹ ФГБУ Научный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

e-mail: Bazarus13.ukr@yandex.ru

Ключевые слова: травма спинного мозга, клеточная терапия, мононуклеарные клетки пуповинной крови человека.

Цель исследования — оценка эффективности внутривенного введения криоконсервированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПКЧ) в остром периоде контузионной травмы спинного мозга (КТСМ) у крыс на восстановление движений конечностей и формирование посттравматических кист [1] и оценка неврологического статуса пациентов с ушибом спинного мозга после введения МКПКЧ.

Исследование выполнено на крысах-самках линии Спрег-Дуоли. Тяжелую КТСМ моделировали по методу «weight-drop» [2]. Использовали МКПКЧ, хранившиеся 3–4 года при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ [3]. Двигательную функцию конечностей крыс оценивали в открытом поле по шкале BBB [3], МРТ-сканирование проводили с применением МРТ высокого поля [5]. Проведено клиническое исследование пациентов с ушибами спинного мозга тяжелой степени и неврологическим дефицитом с применением МКПКЧ. Пациентам вводили 300 млн клеток в/в 4 раза (1 раз в неделю).

Однократное в/в введение МКПКЧ 10 млн клеток в 1 сутки после тяжелой КТСМ достоверно улучшает восстановление двигательной функции задних конечностей относительно уровня группы «самовосстановления» у крыс, а объем образующихся на 4–5 сутки посттравматических кистозных полостей достоверно уменьшается в два раза.

Через 1 год средний прирост по шкале ASIA составил 2,2 балла в группе клеточной терапии и 0,9 в контрольной группе, суммарный показатель двигательной активности верхних и нижних конечностей составил 77 ± 19 и $33 \pm 21,6$ и самостоятельно могли передвигаться 78% и 30% пациентов соответственно в каждой группе.

Проведенное исследование показывает эффективность терапии КМКПКЧ в остром периоде КТСМ.

Литература:

1. Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях. Под ред. М.А. Пальцева, В.Н. Смирнова. М. «Шико». 2012. 176 с.
2. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. *Exp. Neurology*. 1996, V. 139, P. 244.
3. Рябов С.И., Звягинцева М.А., Смирнов В.А. и др. *Бюл.экспер. биол.*, 2014. Т. 157. № 1. С. 98.
4. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. *J. Neurotrauma*. 1995.V.12. N 1. P. 1.
5. Ядгаров М.Я., Смирнов В.А., Базанович С.А. и др. *Нейрохирургия*. 2022. Т24. № 1. С. 38.

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПОРИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

**К.Ю. Базылева^{1,2}, К.Г. Антипова²,
С.В. Крашенинников², С.Н. Малахов²,
Р.В. Шариков², Т.Е. Григорьев²**

¹ Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Научный исследовательский центр Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: bazyleva.ki18@physics.msu.ru

Ключевые слова: лиофилизация, высокопористые материалы, тканевая инженерия.

Пористость в трехмерном каркасе является важным фактором для тканевой инженерии [1, 2]. Рост и внедрение клеток в значительной степени зависят от размера пор внутри каркаса, которыми необходимо тщательно управлять с учетом конкретных параметров в зависимости от материала и применения [1, 3, 4]. Роль пористости заключается в том, что клеточные сети полагаются на взаимосвязанные пути для транспортировки питательных веществ, передачи сигналов клетками и пролиферации, имитируя по структуре окружающую среду нативного внеклеточного матрикса [1, 5]. Одним из распространенных методов получения высокопористых материалов является лиофилизация. Этот метод позволяет получать материалы с высокой удельной поверхностью и различной структурой пор. Первым этапом лиофилизации является заморозка, которая влияет на архитектуру будущих материалов. Таким образом, целью данной работы было создание замораживающей ячейки с контролем условий заморозки для получения высокопористых материалов с регулируемыми свойствами для тканевой инженерии.

Для синтеза материалов использовали водный раствор ПВС (Sigma-Aldrich, США, Mw = 130 кДа) с концентрацией 6%, в который добавляли сшивающий агент — глутаровый альдегид (Sigma-Aldrich, США, 50% водный раствор) в соотношении 0,005 и 0,01 к 1 осново-моль полимера в присутствии соляной кислоты (Компонент-Реактив, Россия, о.с.ч.). После смешивания полученную смесь замораживали при разных условиях в разрабатываемой нами ячейке, состоящей из элементов Пельтье ТВ-127-1.0-1.3. После все замороженные материалы лиофилизировали на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC installation в течении 72 ч при глубине вакуума 0,250 мбар.

Для изучения механических свойств образцы испытывали при одноосном сжатии на универсальной разрывной машине Instron 5965. Из полученных данных определяли модуль упругости полимерных материалов.

Исследование морфологии образцов проводили при помощи растрового электронного микроскопа Phenom XL (ThermoFisher Scientific, США). Изображения получали с использованием детектора обратно рассеянных электронов при ускоряющем напряжении 5 кВ и давлении 10 Па без предварительного нанесения токопроводящего покрытия на образец.

В работе измеряли удельную поверхность полученных материалов в зависимости от способа заморозки и концентрации сшивающего агента. Исследования проводили на анализаторе удельной поверхности и пористости Authosorb iQ (Quantachrome Instruments, США) путем обработки изотермы адсорбции паров азота при температуре 77 К в диапазоне относительных давлений от 10⁻⁵ до 0,99 методом Брюнера-Эммета-Теллера (БЭТ).

В результате работы была разработана и изготовлена замораживающая ячейка из элементов Пельтье. С помощью нее были созданы анизотропные и изотропные полимерные высокопористые материалы на основе ПВС с различной архитектурой.

Работа выполнена при поддержке государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Stratton S. et al. *Bioactive materials*. 2016. V. 1. No. 2. P. 93–108.
2. Bonfield W. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2006. V. 364. No. 1838. P. 227–232.
3. Zeltinger J. et al. *Tissue engineering*. 2001. V. 7. No. 5. P. 557–572.
4. O'Brien F.J. et al. *Biomaterials*. 2005. V. 26. No. 4. P. 433–441.
5. Chan B.P., Leong K.W. *European spine journal*. 2008. V. 17. No. 4. P. 467–479.

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПРИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЕ — СЕГОДНЯ И ЗАВТРА

В.П. Баклаушев^{1,2}, О.В. Дуров¹, В.А. Кальсин^{1,2}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия

² ИМБ РАН, Россия, Москва, Россия

e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Ключевые слова: спинальная травма, нейральные стволовые клетки, прямое репрограммирование, регенеративная терапия, вызываемые потенциалы

В эксперименте на макаках-резусах исследовали эффективность трансплантации тканеинженерных

конструктов на основе биоразлагаемого скаффолда и аллогенных нейтральных прогениторных клеток, полученных путем прямого репрограммирования (drNPCs) при восстановлении неврологического дефицита в результате травмы спинного мозга. Предварительно была разработана модель необратимой спинальной травмы у нечеловекообразных приматов с интраоперационным контролем вызванных потенциалов (ВП), позволяющая получить полный односторонний анатомический перерыв кортикоспинального тракта и заднего столба на уровне Th7-8 (Baklaushev VP, 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. Sox2-позитивные трансплантированные клетки преимущественно обнаруживались в зоне активной регенерации, где они секретируют BDNF, что сопровождалось повышенным уровнем экспрессии синаптофизина клетками хозяина в сером и белом веществе. Трансплантация тканеинженерных конструктов характеризовалась значительно более высоким по сравнению с суспензионным способом введения выживанием клеток. drNPCs в составе тканеинженерных конструктов подвергались нейрональной дифференцировке и выпускали длинные нейриты. Эти результаты так же, как результаты других научных групп, показавших эффективность трансплантации НСК в составе гидрогелей и др. скаффолдов свидетельствуют о потенциальной перспективности тканевой инженерии спинного мозга в терапии необратимой спинальной травмы. Наиболее интересным с нашей точки зрения является комбинирование тканевой инженерии с нейромодуляцией, в частности, с эпидуральной электростимуляцией спинного мозга выше и ниже области поражения параллельно с двигательной реабилитацией.

КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДОПИРОВАННЫХ КАТИОНАМИ ЖЕЛЕЗА

О.В. Баранов, А.Ю. Федотов, В.С. Комлев

*ФГБУ Институт металлургии и материаловедения
им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия*

e-mail: einlied.1@gmail.com

Ключевые слова: фосфаты кальция, октакальций фосфат, композиционные материалы, альгинат натрия

Можно выделить фосфаты кальция (ФК) с молярным соотношением Ca/P в диапазоне 1,33–1,67 как наиболее близкие к минеральному компоненту костной ткани. Эти ФК нашли наиболее широкое применение в хирургии. В настоящее время гидроксипатит (ГА, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), трикальцийфосфат (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) и октакальций фосфат (ОКФ, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) являются основными соединениями, используемыми в медицине для замещения и регенерации костной ткани [1]. Это

связано со схожестью указанных соединений с минеральным составом костной ткани. Несмотря на близость химического состава ГА (отношение Ca/P около 1,67), ТКФ (около 1,5) и ОКФ (около 1,33) свойства указанных соединений имеют и существенные различия. В частности, это может касаться скорости деградации и специфических свойств. Влияние на реакционную способность к фазовым переходам может достигаться за счет модификации фосфатов кальция введением ионов металлов, позволяющих создать программируемые замещенные формы [2]. Кроме того, за счет создания замещенных ФК можно получать различные материалы с необходимыми свойствами, например, высокорезорбируемые или придавать антибактериальные свойства и т.д. [3].

Железо является важным элементом в почках и системе кровообращения, а также в виде микроэлементов оно содержится в твердых тканях, как в депо. Железо участвует во многих сложных процессах, протекающих в организме человека на молекулярном уровне (например, синтез эритроцитов, преобразование глюкозы крови в энергию и выработку ферментов). Кроме того, допирование фосфатов кальция может придать им магнитные свойства, которые могут быть использованы в различных биомедицинских применениях, таких как восстановление тканей, магнитно-резонансная томография, доставка лекарств, разделение клеток и лечение злокачественных образований на основе гипертермии.

Целью данной работы являлось разработка композиционных гидрогелей на основе альгината натрия и низкотемпературных фосфатов кальция, допированных катионами железа с содержанием керамической составляющей до 15 масс. %.

Установлено, что введение катионов железа в процессе синтеза дикальцийфосфат дигидрата не оказывают влияния на фазовый состав конечного продукта. Однако наблюдается изменение морфологии частиц ДКФД, происходит уменьшение размеров частиц ДКФД при увеличении концентрации катионов Fe^{3+} .

Изучено влияние введения катионов железа на процесс гидролиза ДКФД в ОКФ. Показано, что катионы железа не оказывают влияния на фазовый состав и морфологию продуктов гидролиза ДКФД. Полученный порошок по фазовому составу и морфологии соответствует ОКФ. Результаты химического анализа показывают, что экспериментальная концентрация железа в ОКФ линейно растет с повышением теоретического значения, но меньше него практически в 2 раза.

Разработаны композиционные гидрогели на основе альгината натрия и полученных низкотемпературных фосфатов кальция, допированных катионами железа с содержанием керамической составляющей до 15 масс. % и изучены их физико-химические и механические свойства.

Литература:

1. Komlev V.S., Popov V.K., Mironov A.V., Fedotov A.Y., Teterina A.Y., Smirnov I.V., Bozo I.Y., Rybko V.A., Deev R.V.) 3D printing of octacalcium phosphate bone substitutes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. 3:81.
2. Shurtakova D., Yavkin B., Gafurov M., Mamin G., Orlinskii S., Kuznetsova L., Bakhteev S., Ignatyev I., Smirnov I., Fedotov A., Komlev V. Study of radiation-induced stable radicals in synthetic octacalcium phosphate by pulsed EPR Magnetic Resonance in Solids. *Electronic Journal.* 2019. V. 21. № 1. P. 19105
3. Glenske K., Donkiewicz P., Köwitsch A., Milosevic-Oljaca N., Rider P., Rofall S., Franke J., Jung O., Smeets R., Schnettler R., Wenisch S., Barbeck M. Applications of Metals for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 826.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ТРАХЕИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ МИКРОПЕРФОРИРОВАННОГО ХРЯЦА ТРАХЕИ ЧЕЛОВЕКА И НАЗАЛЬНЫХ ХОНДРОЦИТОВ

Д.С. Барановский^{1,2}, Я. Демнер³, С. Нюрнбергер⁴,
А.В. Ляндуп², Х. Редл⁴, М. Хилпберт⁵,
М.Е. Крашенинников², О.А. Красильникова¹,
И.Д. Клабуков^{1,2}, И. Мартин^{3,5}, А. Барберо⁵

¹ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Российский Университет Дружбы Народов, Москва, Россия

³ Университет Базеля, Базель, Швейцария

⁴ Институт экспериментальной и клинической травматологии им. Людвиг Больцмана, Вена, Австрия

⁵ Университетский госпиталь Базеля, Базель, Швейцария

e-mail: doc.baranovsky@gmail.com

Ключевые слова: девитализация, лазерная перфорация, назальные хондроциты, ортотопическая имплантация, тканевая инженерия, тканеинженерная трахея.

Применение тканеинженерных имплантатов трахеи представляет собой перспективную стратегию ее реконструкции и может стать последним шансом радикального лечения для пациентов с обширными поражениями трахеи. Использование кадаверной хрящевой ткани ранее позволило получить биосовместимые матриксы-носители с оптимальными механическими свойствами [1]. Однако, повышенная плотность такого материала препятствовала его заселению клетками и последующему постимплантационному ремоделированию.

В исследовании мы предложили использовать лазерную перфорацию хрящевой ткани человека для ее эффективной колонизации назальными хондроцитами, а также исследовали биосовместимость и эффективность полученной тканеинженерной конструкции при восстановлении обширного дефекта трахеи в эксперименте.

Образцы нативной трахеи человека подверглись девитализации и высокоточной лазерной микроперфорации инфракрасным лазером. Девитализация позволяла получить матрикс-носитель с сохранной архитектоникой [1,2]. Лазерная перфорация полностью покрыла поверхность матрикса микропорами диаметром 100–200 мкм с плотностью 4–6 микропор/мм².

Назальные хондроциты культивировались на микроперфорированной хрящевой ткани в течение 1 недели, эффективно колонизируя микропоры. Полученные тканеинженерные конструкции имплантировали подкожно бестимусным гипоиimmunным мышам. Глубина колонизации существенно улучшилась через 8 недель после эктопической имплантации конструкций. Отмечалось заполнение микропор новообразованным хрящевым матриксом, при этом синтез коллагенов I и II типов и агрегана был подтвержден ОТ-ПЦР.

Конструкции также были имплантированы ортотопически в дефекты стенки трахеи кроликам на срок 8 недель. Через 4 недели после имплантации выполнялась компьютерная томография (КТ) шеи для промежуточной оценки состояния просвета трахеи и положения конструкции. Было показано, что имплантация не привела к дислокации конструкции или стенозу трахеи. Матрикс-носители и тканеинженерные конструкции

трахеи анализировались до и после имплантации с помощью СЭМ, микротомографии, иммуногистохимических исследований и цифровой ПЦР.

Микротомография высокого разрешения, выполненная через 8 недель после операции, выявила полную интеграцию конструкции в стенку органа. Отмечалось восстановление слизистой оболочки трахеи на всей внутренней поверхности тканеинженерной конструкции, подтверждаемое иммуногистохимическим исследованием [2]. Иммунологическая оценка реакции реципиента на ксеногенный донорский материал, заселенный аллогенными клетками, не выявила признаков отторжения имплантата.

Имплантация биопротезов, основанных на микроперфорированных хрящевых тканях, представляет собой перспективную стратегию восстановления трахеи в клинических исследованиях.

Литература:

1. Барановский Д.С., Демченко А.Г., Оганесян Р.В. и др. Вестник РАМН 2017, Т. 72. № 4. С. 254–260.
2. Baranovskii D., Demner J., Nürnbergger S. et al. Cartilage 2022. V. 13. № 1. P. 19476035221075951.

МИКРОРНК-29С И 129 В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СПОСОБСТВУЮТ РАЗРЕШЕНИЮ ФИБРОЗА ЛЁГКИХ ЧЕРЕЗ УПРАВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ МИОФИБРОБЛАСТОВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Н.А. Басалова¹, М.А. Виговский^{1,2},
М.С. Арбатский², О.А. Григорьева¹,
А.Е. Толстолужинская², У.Д. Дьячкова²,
В.С. Попов^{1,2}, М.Н. Карагаюр^{1,2}, Н.И. Калинина²,
Ж.А. Акопян^{1,2}, А.Ю. 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

e-mail: natalia_ba@mail.ru

Ключевые слова: фиброз, микроРНК, внеклеточные везикулы, мезенхимные стромальные клетки, миофибробласты, дифференцировка

Фиброз лёгких представляет собой прогрессирующее замещение функциональной ткани на стромальную, что может приводить к дисфункции органа. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают способностью к регуляции фиброза, однако молекулярные механизмы данного эффекта остаются малоизученными. Известно, что ряд подходов к подавлению фиброза основан на подавлении активности миофибробластов и стимулировании их дифференцировки в нормальные тканеспецифичные клетки. Одними из ключевых молекул, регулирующих эти процессы, являются микроРНК, которые транспортируются преимущественно в составе внеклеточных везикул (ВВ-МСК). Поэтому в данной работе было исследовано влияние микроРНК в составе ВВ-МСК на дифференцировку миофибробластов в процессе развития фиброза *in vitro* и *in vivo*.

ВВ были выделены из кондиционированной среды МСК человека и охарактеризованы стандартными методами. Ингибирование исследуемых микроРНК было

проведено путём трансфекции ВВ-МСК синтетическими олигонуклеотидами. Эффект от применения ВВ-МСК оценивали с использованием *in vitro* модели дедифференцировки миофибробластов человека (ИЦХ, вестерн-блоттинг, ОТ-ПЦР, модель контракции коллагенового диска) и *in vivo* модели индуцированного блеомицином фиброза лёгких у мышей C57Bl/6, с интратрахеальным введением ВВ-МСК через 14 дней после введения блеомицина.

Мы показали, что у животных в группе с введением ВВ-МСК площадь депонированного коллагена и выраженность фиброза легких по шкале Эшкрофта значительно уменьшились, а площадь функциональной легочной ткани увеличилась на 40–45% по сравнению с контрольными группами. Мы предположили, что такое влияние ВВ-МСК на прогрессирование фиброза основано на их способности регулировать трансдифференцировку стромальных клеток в активированные фибробласты и миофибробласты — основные драйверы фиброза. Мы показали, что *in vitro* ВВ-МСК стимулировали дедифференцировку миофибробластов на морфологическом и функциональном уровнях за счет переноса специфических микроРНК. Мы продемонстрировали, что не одна микроРНК, а комплекс, состоящий из микроРНК-129 и -29с, оказал решающее влияние на наблюдаемые эффекты *in vitro* и *in vivo*. Данные микроРНК подавляют синтетическую активность клеток, уменьшая синтез коллагена I типа, а также способствуют дедифференцировке клеток, снижая количество компонентов фокальных контактов — винкулина, альфа-актинина 1 и 4 типа. Подавление микроРНК-129 и -29с в ВВ-МСК значительно снизило их антифибротический эффект *in vivo*, что привело к увеличению количества активированных фибробластов, миофибробластов и фибротических очагов в легких.

Таким образом мы показали, что комплекс специфических микроРНК, состоящий из микроРНК-29с и -129 и переносимый в составе ВВ-МСК, способен стимулировать дедифференцировку миофибробластов *in vitro* и *in vivo*, тем самым способствуя подавлению прогрессирования фиброза. Работа поддержана РФФИ (№ 20-04-60487 и № 20-315-90120).

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТОДОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ, КОДИРУЮЩИМИ КОРОТКИЕ ШПИЛЕЧНЫЕ РНК

Л.С. Басович¹, А.Б. Малашичева²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: L.Basovich@yandex.com

Ключевые слова: РНК-интерференция, короткие шпилечные РНК, лентивирусный вектор, трансдукция, трансфекция, сайленсинг генов.

РНК-интерференция представляет собой механизм посттранскрипционного геноспецифического сайленсинга, обусловленного деградацией мРНК в эукариотических клетках посредством ее узнавания комплементарной малой интерферирующей РНК (миРНК), находящейся в комплексе RISC с белком AGO-2, обладающим эндонуклеазной активностью.

Применение метода трансфекции миРНК неэффективно в связи с непродолжительным нокдауном гена. Другая

форма РНК-интерференции включает использование коротких шпилечных РНК (кшРНК), доставляемых трансдукцией лентивирусными векторами, что позволяет получить клеточную линию со стабильным нокдауном гена.

Целью исследования являлось выявление наиболее эффективного сочетания введения шпилечных конструкций для подавления сверхэкспрессии гена.

Для реализации РНК-интерференции были сконструированы лентивирусные частицы, кодирующие ген комплементарной кшРНК. Регулирование экспрессии рассматривалось в двух сочетаниях: трансдукцией кшРНК через 24 часа после активации гена интереса и реализацией РНК-интерференции за 24 часа до сверхэкспрессии. В качестве генов интереса выступал ген GFP, ген ZBTB-16 и гены сигнального пути Notch (рецепторы Notch1, 3, 4).

Результаты эффективности применения метода РНК-интерференции были оценены методами ПЦР в реальном времени через 48 часов, проточной цитометрией через 72 часа и иммунофлуоресцентной окраской клеток через 96 часов после трансдукции.

Анализ экспрессии гена GFP показал эффективное сочетание трансдукции вирусом, кодирующим кшРНК, за 24 часа до сверхактивации.

Анализ экспрессии гена *HEY1* методом количественной ПЦР указал на наибольшую эффективность сайленсинга при запуске механизма РНК-интерференции за 24 часа до сверхэкспрессии генов рецепторов сигнального пути Notch.

Подавление экспрессии транскрипционного фактора ZBTB-16, напротив, эффективнее при трансдукции лентивирусными частицами, кодирующими соответствующую кшРНК, через 24 часа после активации целевого гена.

Таким образом, последовательность введения генетических конструкций при помощи лентивирусной трансдукции должна быть подобрана индивидуально для каждой пары ген-кшРНК. Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-14-00152.

ЖИВАЯ ТРЕХМЕРНАЯ МОДЕЛЬ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОГО РАКА ДЛЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ И ТЕСТИРОВАНИЯ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ И МЕТОДОВ ТЕРАПИИ

А.Н. Бастрич¹, Д.А. Петрова¹, Б.Я. Алексеев², А.А. Рослякова¹, Д.Г. Бельцевич¹, П.А. Никифорович¹, Н.С. Кузнецов¹, Е.В. Бондаренко¹, С.А. Сергиенко³, Г.Д. Ефремов³, Л.С. Урсува¹

¹ НЦМУ Национальный центр персонализированной медицины эндокринных заболеваний, ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

³ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: Bastrich.Asya@endocrincentr.ru

Ключевые слова: раковые органоиды, трехмерная модель опухолевой ткани, аденокортикальный рак, злокачественное новообразование коры надпочечника, органоподобные культуры.

Аденокортикальный рак (АКР) представляет собой редкое злокачественное новообразование коры

надпочечников, отличающееся, как правило, крайне агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом. Общая, неранжированная по стадиям заболевания, пятилетняя выживаемость колеблется от 16 до 38% [1].

Персонализированная терапия позволяет существенно повысить эффективность лечения онкобольных [2]. Трехмерные раковые органоиды культуры (органойды) можно получать из биопсий или резекций опухоли, размножать *in vitro* и хранить в замороженном виде с возможностью разморозить живую культуру в любое время [3]. Органоиды сохраняют генетическую и клеточную гетерогенность исходной опухоли и позволяют определять индивидуальный ответ опухоли на лекарственную терапию/метод с наивысшей для *in vitro* моделей предсказательной силой [4]. На сегодняшний момент, вероятность получения персонализированной самоподдерживающейся линии органоидов может достигать 95% и зависит от вида рака. Разработаны методики получения органоидов рака молочной железы, рака яичников, рака легкого, рака кишечника, рака предстательной железы и др. [5], но нет ни одной публикации об успешном культивировании органоидов АКР.

Критически важными компонентами системы культивирования раковых органоидов являются: среда культивирования, внеклеточный матрикс для культивирования и метод подготовки образца опухоли перед началом культивирования. Образцы АКР были получены в результате хирургического удаления опухолей, проведенных в НМИЦ эндокринологии. Применение стандартной системы культивирования, успешно опробованной ранее для получения линий органоидов рака прямой кишки, не привело к росту органоидов АКР *in vitro*. В результате анализа опубликованных данных по биологии развития и составам сред для первичных культур, был определен фактор X, который критически важен для роста тканей здорового надпочечника человека *in vivo* и *in vitro*. Добавление фактора X в среду для культивирования органоидов привело к росту трехмерных клеточных структур АКР, имеющих характерную для органоидов морфологию, и, впервые в мире, позволило получить самоподдерживающуюся линию органоидов классического морфологического варианта АКР. Иммуногистохимический анализ подтвердил злокачественную природу органоидных структур. Источник финансирования — грант НЦМУ 075-15-2020-310.

Литература:

1. Мельниченко Г.А., Алексеев Б.Я., Бельцевич Д.Г. и др. Проблемы эндокринологии. 2014. 60 (2): 51–67.
2. Jackson S., Chester J. Int. J. Cancer. 2015. V. 127. P. 262.
3. Drost J., Clevers H. Nat. Rev. Cancer. 2018. V. 18. P. 407.
4. Kretzschmar K.J. Mol. Med. 2021. V. 99. P. 501.
5. Driehuis E., Kretzschmar K., Clevers H. Nature Protocols. 2020. V. 15. P. 3380.

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ДИНАМИКЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Е.И. Бахмет¹, М.Н. Гордеев¹, А.С. Зиновьева^{1,2}, Е.Е. Петренко^{1,2}, А.Н. Томилин¹

¹ ФГБНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: e.bakhmet@incras.ru

Ключевые слова: Nanog, Oct4, Sox2, ЭСК

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических, а также в половые клетки, то есть являются плюрипотентными. В последнее время, принято выделять несколько типов плюрипотентных стволовых клеток, в зависимости от стадии эмбриогенеза, работающих сигнальных путей и факторов роста, необходимых для поддержания таких клеток в культуре. Наличие такой динамики плюрипотентных состояний ставит новые задачи в изучении транскрипционных факторов, необходимых для функционирования ЭСК. Кроме того, появляются свидетельства роли некоторых факторов плюрипотентности в определении судьбы клетки — её спецификации в том или ином направлении.

В ходе наших исследований, мы показали, что полиЦ-связывающий белок Pcbp1 необходим для правильного перехода из наивного (раннего) плюрипотентного состояния в праймированное (позднее). Этот белок участвует в тонкой настройке МАРК-сигнального пути, и препятствует дифференцировке в направлении первичной энтодермы. При нокауте Pcbp1 в ЭСК, в начале указанного перехода, помимо активации генов «праймированной» плюрипотентности, происходит запуск экспрессии генов первичной энтодермы, что приводит к апоптозу и замедлению созревания ЭСК.

Также нам удалось выяснить, что экспрессия Nanog необходима для корректной спецификации ЭСК в направлении дефинитивной энтодермы. Уровень этого фактора падает при переходе в «праймированное» состояние. При этом, с началом энтодермальной дифференцировки, экспрессия Nanog ре-активируется, что согласуется с данными, полученными при изучении эмбрионального развития мыши. Мы показали, что элиминация этого фактора не влияет непосредственно на запуск этой спецификации, т.к. наблюдается активация типичных маркеров Sox17 и Foxa2. Однако количество энтодермальных клеток в отсутствие Nanog снижается в пять раз.

Нами также получены новые данные о ключевых аминокислотах Oct4, участвующих в опосредовании контакта с его партнёром — Sox2. Замена этих аминокислот на те, что представлены у его паралога, привели к тому, что этот фактор стал функционировать как индуктор нейроэктодермальной спецификации. В настоящий момент мы работаем над выявлением роли Oct4 и Sox2 в мезодермальной и эктодермальной дифференцировке, соответственно.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА 2D МОДЕЛИ АНГИОГЕНЕЗА IN VITRO

И.Б. Белоглазова¹, Е.С. Зубкова¹, К.В. Дергилев¹, Ю.Д. Василец¹, Е.В. Парфенова^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия.

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

e-mail: irina.beloglazova@cardio.ru

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, ангиогенез, Notch, EndoMT

Модель ангиогенеза на Матригеле является самой известной и простой 2D моделью *in vitro*. В ней эндотелиальные клетки (ЭК) формируют капиллярно-подобные структуры (КПС) только за счет взаимодействия с ростовыми факторами и белками внеклеточного матрикса (ВМ), входящими в состав Матригеля.

Другая 2D модель ангиогенеза — сокультивирование ЭК с клетками стабилизаторами — мезенхимными стромальными (МСК) на пластике, предварительно не покрытом белками ВМ. В данной модели источниками ВМ и ростовых факторов являются МСК. Помимо этого, и сами межклеточные взаимодействия ЭК и МСК могут вносить вклад в формирование КПС ЭК.

Целью работы было сравнительное изучение профиля экспрессии ряда генов в ЭК, вовлеченных в процесс ангиогенеза в разных моделях: ЭК, формирующие КПС на Матригеле, ЭК в ко-культуре с МСК, ЭК в конфлюэнтном монослое и делящиеся/мигрирующие ЭК.

Нормировку полученных данных проводили к ЭК в конфлюэнтном монослое.

Мы обнаружили, что:

1) Анализ экспрессионного профиля ЭК с помощью программы Heatmaper показал, что в ЭК на Матригеле по отношению к ЭК в ко-культуре и делящимся/мигрирующим ЭК активировались разные кластеры генов. Данные различия затрагивают гены межклеточных контактов, в том числе Notch и эфриновую сигнализацию.

2) В ЭК на модели Матригеля, в кокультуре и делящимися/мигрирующими ЭК апрегулировалось 4 общих гена: PLA1, PLAUR, JAG1 and NOTCH2.

3) Гены, ассоциированные с EndMT апрегулировались как на Матригеле, так и в ко-культуре, причем в кокультуре апрегуляция являлась более выраженной.

4) В ко-культуре происходила активная экспрессия белков ВМ, причем это происходило и в ЭК и в МСК. Более того, экспрессия коллагена¹ в ЭК при этом возрастала более чем в 77 тысяч раз.

5) На Матригеле повышалась экспрессия эфриновых лигандов EFNA3, EFNA5, EFNB2, EFNB3 и рецепторов EPHB4, EPHB6. В делящихся/мигрирующих ЭК происходила даунрегуляция генов почти всех лигандов и рецепторов, а увеличение отмечалось только для рецептора EPHA2. В ЭК в ко-культуре происходила даунрегуляция генов лигандов EFNA1, EFNB1, EFNB2, EFNB3 и рецептора EPHB4, а также апрегуляция генов рецепторов EPHA2, EPHB1.

6) Даунрегуляция генов CCN1 и CCN2 в ЭК на Матригеле говорит об активации сигнального пути Hippo, в то время как в делящихся/мигрирующих ЭК данный путь не активен.

7) В ЭК на Матригеле происходила апрегуляция всех лигандов и рецепторов Notch, и активация сигнализации Notch. В кокультуре происходила апрегуляция JAG1, JAG2, NOTCH2 и даунрегуляция DLL1 и DLL2 и подавление сигнализации.

Мы можем заключить, что 2D модели ангиогенеза in vitro на Матригеле и в ко-культуре отражают различные стадии ангиогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-15-00327.

СИНТЕЗ И ОФОРМЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНОВОГО ВОЛОКНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС

М.Б. Белякова, Н.В. Костюк, М.В. Черноуцкий, Д.В. Лещенко, М.В. Миняев

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ, Тверь, Россия

e-mail: mayabe@yandex.ru

Ключевые слова: жировая ткань, мезенхимные стромальные клетки, коллагеновые волокна в культуре.

Сборка коллагена определяется контактами фибрилл с поверхностью фибробласта, и пространственное расположение клетки является обуславливающим в ориентации пучков, что, несомненно, сказывается на особенностях коллагенового матрикса, получаемого при культивировании фибробластов различного происхождения. В данной работе изучалась динамика формирования коллагена, создаваемого в донной культуре клетками жировой ткани, при стимуляции коллагеногенеза бычьей сывороткой и аскорбатом. Целью работы было выявить возможности фибриллогенеза клетками жировой ткани при донном культивировании различной длительности в условиях, предпочтительных для фибробластов.

В эксперименте использовались клетки жировых эксплантов крыс, культивированные в среде DMEM с высокой глюкозой, аскорбатом и 10%-й бычьей сывороткой без пересева в течение 4–16 недель. Контрольные чашки в первую неделю культивирования стимулировались фетальной сывороткой и/или содержались без аскорбата. Фотодокументирование формирования коллагена проводилось при фазовой микроскопии живых культур и с окраской по Ван-Гизону или Маллори.

Фибробластоподобная морфология культур мезенхимных стромальных клеток достаточно легко возникает при пересевах, и при уплотнении застила такие клетки не удается снять с помощью трипсина, однако это становится возможным благодаря применению коллагеназы. Если клетки не пассировались больше двух недель, многие из них при такой дезагрегации сохраняли вытянутую форму и сходили с подложки с элементами созданного ими матрикса. При старении культуры без пересева до 10–16 недель наблюдался апоптоз клеток, с сохранением визуализированных при фазово-контрастном микроскопировании и гистологически окрашивавшихся коллагеновых волокон. Необходимо отметить, что аскорбат без какой-либо иной стимуляции столь значительно усиливал коллагеногенез и фибриллогенез, что за 60 дней появлялись оформленные волокна длиной 300–500 мкм.

При использовании бычьей сыворотки и стеклянного культурального сосуда возможно целевое получение коллагенового матрикса слоистой архитектуры, образованного культурой мезенхимных клеток.

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА КОНСТИТУТИВНО УВЕЛИЧИВАЕТСЯ В КОСТЯХ СУБЛЕТАЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

А.Е. Бигильдеев¹, Д.М. Карпенко¹, А.В. Садовская^{1,2}, А.И. Дорофеева¹

¹ *ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия*

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

e-mail: bigildeev.ae@gmail.com

Ключевые слова: ФНО α , ИЛ-1 β , облучение, фактор роста стромы, NF- κ B, кости, индукция экспрессии.

Облучение мышей в сублетальной дозе радиации приводит к повышенному уровню интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 β) в крови, который остается повышенным не только в острую фазу после облучения, но и позднее, неопределенно долго. Мы также установили, что ИЛ-1 β — ростовой фактор для стромальных клеток-предшественниц костного мозга. При сингенной имплантации костного мозга под капсулу почки облученных мышей в месте операции образуется очаг

эктопического кроветворения повышенной клеточности, что указывает на наличие расширенной кроветворной территории, образованной индуцированными ИЛ-1 β стромальными клетками-предшественницами. Аналогичный эффект происходит при использовании необлученного реципиента, которому под кожу предварительно имплантировали кости от облученного сингенного донора.

Согласно нашему предположению, повышению ИЛ-1 β в крови облученных животных предшествует краткосрочное или конститутивное повышение экспрессии в костях неизвестного фактора, который попадает в кровь и стимулирует где-то в организме повышенный синтез и секрецию ИЛ-1 β в периферическую кровь, что и приводит к наблюдаемому феномену. Вероятно, это происходит за счёт деметилирования промотора ИЛ-1 β , поскольку эффект наблюдается в течение нескольких месяцев после облучения. Фактором, индуцирующим повышение уровня ИЛ-1 β , может являться фактор некроза опухоли альфа (ФНО α). ФНО α — один из ключевых регуляторов кроветворения и, в частности, врожденного иммунитета. Связывание ФНО α с рецепторами на поверхности клеток приводит к активации таких сигнальных каскадов, как NF- κ B, JNK и каспазы-8, которые важны для активации воспаления, пролиферации и апоптоза, соответственно. ИЛ-1 β , в свою очередь, является одной из мишеней NF- κ B.

Для проверки предположения мы исследовали экспрессию ФНО α в костях необлученных ($n = 3$) и облученных в дозе 5 Гр ($n = 3$) и 6 Гр ($n = 5$) мышей линии C57Black через 3–5 месяцев после экспозиции. Из бедер и голени выделяли РНК, строили кДНК и проводили ПЦР в режиме реального времени на *Tnfa* (ФНО α). Нормализацию проводили по генам домашнего хозяйства *Sdha* и *Rpl13a*. Показано, что в костях мышей, облученных в дозе 5 Гр и 6 Гр, через несколько месяцев наблюдается повышенная экспрессия ФНО α в $2,5 \pm 0,3$ и $2,3 \pm 0,3$ раз, соответственно, по отношению к контролю. Совместно с данными других экспериментов, демонстрирующих способность ФНО α деметилировать CpG в промоторе гена *Il1b*, кодирующего ИЛ-1 β , это усиливает гипотезу о том, что в наблюдаемом феномене ИЛ-1 β является промежуточным звеном, которое регулируется ФНО α .

Наши эксперименты подтверждают важную роль ФНО α не только для кроветворных клеток, но также и для клеток кроветворного микроокружения *in vivo*, стромальных клеток костного мозга. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00459.

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СОХРАНЕНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ У КРЫС ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

С.О. Бикеева¹, О.Н. Чернова^{2,3}, Д.Э. Сабирова¹,
Е.В. Федоренко¹, Т.В. Балтина¹

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

² Кафедра морфологии человека, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Кафедра патологии и судебной медицины, ЧОУ ВО Медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: sofya_bikeeva01@mail.ru

Ключевые слова: травма спинного мозга, локальная гипотермия, иммуногистохимический анализ, кавитации, синаптофизин, миелинообразующие клетки, ремиелинизация.

Целью работы явилось проведение морфометрической оценки серого и белого вещества спинного мозга у крыс после травмы спинного мозга (ТСМ) и локальной гипотермии (ТСМ+ГТ).

Исследование проведено на 24 самцах крыс породы Sprague Dawley, весом 160–180 г. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм. В условиях операции мыши, с соблюдением всех правил асептики и антисептики животным наносилась контузионная ТСМ на уровне Th8 по А.Р. Аллену [1911] [1]. Для нанесения локальной интраоперационной гипотермии использовался приготовленный хладагент, который на 20 минут помещался в декомпрессионном окне ламинэктомированного позвонка на твердую мозговую оболочку спинного мозга, как описано ранее [2]. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7 и 21 сутки. Криосрезы окрашивали иммуногистохимически с антителами к синаптофизину (в разведении 1:400, ab32127, RabMab, США) и миелин (в разведении 1:100, ab40390, Abcam, США). Проводили анализ и сравнение общего объема полостей в сером и белом веществе спинного мозга.

В результате контузионной травмы спинного мозга в зоне поражения наблюдались множественные кавитации. В группе ТСМ площадь кавитации в сером веществе в 1 сутки после травмы была на 65 % выше, чем в группе ТСМ+ГТ. В дальнейшем область кавитации в группе ТСМ снижалась. На 21 сутки площадь образованных полостей была на 40 % выше в группе ТСМ+ГТ, чем в группе ТСМ. Иммуногистохимический анализ криосрезов показал, что в клетках серого вещества передних рогов спинного мозга экспрессия синаптофизина, начиная с 1 суток до 7 суток, была выше в группе ТСМ+ГТ по сравнению с группой ТСМ. На 3 сутки количество миелинообразующих клеток было выше в группе ТСМ. Наибольшая концентрация миелинообразующих клеток наблюдалась в сером веществе задних рогов спинного мозга на 7 сутки в группе ТСМ+ГТ.

Таким образом, мы показали, что интраоперационная локальная гипотермия способствует сохранению нервной ткани серого и белого вещества спинного мозга после ТСМ у крыс. Локальная гипотермия позволяет уменьшить степень демиелинизации аксонов в передних рогах серого вещества спинного мозга после ТСМ у крыс, способствует восстановлению синаптических контактов между клетками и более раннему запуску процессов ремиелинизации. Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Литература:

1. Baltina T.V., Silantyeva D.I., Loban E. Yu. et al. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. 2018. V. 160. № 4. P. 630.
2. Iafarova G.G., Tumakaev R.F., Khazieva A.R. et al. Biofizika. 2014. V. 59. № 5. P. 1017.

3D БИОПЕЧАТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ НА ОСНОВЕ СФЕРОИДОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

П.Ю. Бикмулина¹, Н.В. Кошелева^{2,3},
А.И. Шпичка^{1,2}, П.С. Тимашев^{1,2,4}

¹ Центр «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Сеченовский Университет, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

³ ФГБНУ НИИ Общей Патологии и Патофизиологии, Москва, Россия

⁴ ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

e-mail: bikmulina_p_yu@staff.sechenov.ru

Ключевые слова: 3D биопечать, сфероиды, гидрогель, мезенхимные стромальные клетки.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются наиболее часто используемым типом клеток для трехмерной биопечати, в том числе на основе сфероидов. МСК обладают широким спектром биологических свойств, различающихся в зависимости от источника клеток. Сведения об особенностях каждой тканеспецифичной популяции МСК позволят повысить выживаемость и функциональность тканевых эквивалентов, полученных методом 3D биопечати. Целью данной работы стало сравнение ряда параметров, таких как выживаемость, метаболическая активность, способность к пролиферации, миграции и дифференцировке, сфероидов из МСК в зависимости от источника клеток при 3D экструзионной биопечати.

Биочернила для 3D экструзионной биопечати состояли из двух компонентов — гидрогеля и сфероидов. В состав гидрогеля входил желатин, фибрин, модифицированный акриловым полиэтиленгликолем (ПЭГ), и фотoinициатор — рибофлавин. Сфероиды формировали в течение 3 суток из МСК, выделенных из подкожной жировой ткани и альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека. После биопечати на 3D-экструзионном биопринтере BioX CellInk проводили двухэтапную сшивку конструкций и культивировали их при стандартных условиях (37°C, 5%CO₂) от 3 до 21 суток.

Напечатанные конструкции на основе сфероидов из МСК из обоих источников были жизнеспособны и метаболически активны, однако темпы пролиферации клеток в их составе отличались. Кроме того, сфероиды из МСК жировой ткани быстрее мигрировали в гидрогеле, формируя обширные кластеры клеток. Сфероиды из МСК альвеолярной слизистой оболочки свободной десны формировали более длинные, тонкие и разветвленные отростки в конструктах. Также в полученных конструктах установлены различия эффективности дифференцировки в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Таким образом, полученные методом 3D биопечати конструкции на основе сфероидов из МСК из различных источников различаются по физиологическим и морфологическим свойствам. Сфероиды из МСК жировой ткани позволяют быстро заполнить объем напечатанного гидрогелевого конструкта, обеспечивая высокую плотность клеток, в то время как сфероиды из МСК альвеолярной слизистой оболочки свободной десны эффективнее формируют отростки в конструктах, занимая более обширную площадь конструкта.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 22-75-10120, сфероиды и биопечать).

СВЯЗАННЫЕ С ИНТЕГРИНАМИ КИНАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО АКТИНА И ПРОЦЕССА ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЫ НА КОЖНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

Н.Б. Бильдюг

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nbildyug@gmail.com

Ключевые слова: связанные с интегринами киназы, гладкомышечный актин, фибробласты кожи

Гладкомышечный α -актин (α -SMA) считается маркером многих заболеваний [1], однако механизмы, регулирующие его экспрессию, до сих пор остаются неизвестными. Показано, что при раневых повреждениях кожи происходит превращение фибробластов в миофибробласты, которое сопровождается перестройкой актиновых структур и экспрессией α -SMA, а также интенсивным синтезом компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) [2]. Связь между матриксом и клетками обеспечивается трансмембранными белками интегринами, которые способны передавать внеклеточные сигналы внутрь клеток путем привлечения к своим цитоплазматическим доменам нерецепторных киназ, участвующих в дальнейших сигнальных каскадах [3]. Целью настоящей работы являлось изучение роли интегрин-опосредованных сигнальных путей в регуляции α -SMA и процесса заживления раневых повреждений кожи. Для этого использовали оптимизированную *in vitro* модель раны на монослойной культуре кожных фибробластов человека и проводили оценку динамики интегринов и ключевых связанных с ними киназ — киназы фокальной адгезии (FAK) и интегрин-связанной киназы (ILK) — в процессе заживления имитированной раны.

С помощью методов иммунофлуоресценции и Вестерн-блоттинга было показано, что после нанесения имитированной раны в фибробластах происходило формирование выраженных стресс-фибрилл с появлением гладкомышечной изоформы актина, которое сопровождалось накоплением коллагенового матрикса во внеклеточном пространстве. В целом, эти данные указывают на процесс превращения фибробластов в миофибробласты и подтверждают адекватность использования настоящей модели. Результаты оценки интегринов и связанных с ними киназ показали постепенное повышение уровня интегрин бета-1, а также киназы FAK в процессе заживления имитированной раны, при этом для ILK, напротив, наблюдалось постепенное снижение по сравнению с контрольными клетками. Ингибирование указанных киназ с помощью коммерческих ингибиторов приводило к снижению уровня α -SMA в фибробластах и нарушению процесса заживления раны, при этом ингибирование ILK имело более выраженный эффект. В целом, в ходе работы были получены результаты, указывающие на роль интегрин-опосредованных сигнальных путей в регуляции процесса заживления раны.

Литература:

1. Charonnier C., Gabbiani G.J. Pathol. 2004. V. 204(4). PP. 386–95.
2. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. Sci. Transl. Med. 2014. V. 6. P 265sr6.
3. Katsumi A., Orr A.W., Tzima E. et al. J. Biol. Chem. 2004. V. 279. PP. 12001–4.

ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА ЭЛАСТИЧЕСКОГО ХРЯЩА ИГЛИСТЫХ МЫШЕЙ

А.И. Билялов^{1,2}, Д.Д. Филимошина¹, Н.С. Филатов¹, А.А. Билялова¹, А.А. Титова¹, Л.Р. Гатауллина¹, А.С. Плюшкина¹, Е.И. Шагимарданова¹, Р.В. Деев^{3,4}, А.П. Киясов¹, О.С. Козлова¹, А.А. Несмелов¹, О.А. Гусев^{1,5,6}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия

³ ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Медицинский факультет университета Джунтендо, Токио, Япония

⁶ НМИЦ эндокринологии, Москва, Россия

e-mail: BilyalovAir@yandex.ru

Ключевые слова: Acomys, хондрогенез, иглистая мышь.

В большинстве случаев повреждение хряща ведет к образованию волокнистой соединительной ткани, которая не обладает необходимыми биохимическими и механическими свойствами [1,2].

Изучение механизмов репаративной регенерации у животных, обладающих способностями к восстановлению тканей без развития рубца, поможет раскрыть закономерности репаративного гистогенеза. Такие способности к регенерации описаны у иглистых мышей или мышей рода *Acomys* [3].

Целью данного исследования являлась оценка репаративного хондрогенеза эластического хряща у мышей рода *Acomys*.

Эксперимент проведен на двух группах животных: самцы мышей *Acomys cahirinus* (n=12) и линии Balb/c (n=12), которым был смоделирован хирургический дефект ушной раковины (диаметр дефекта 3 мм / полное удаление ушной раковины)

Оценку результатов и забор материала производили на 2, 5, 15, 21 сутки и с 1 по 3 месяц после операции. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также орсеином.

К 15 суткам после операции в группе мышей Balb/c в краях поврежденного хряща проксимальной и дистальной части дефекта выявили репаративный хондрогенез, характеризующиеся накоплением неупорядоченных вновь образованных хондроцитов и отсутствием структурированной надхрящницы. Никаких других элементов репарации, кроме тех которые были выявлены на 15 сутках, на других сроках эксперимента не были обнаружены.

К 15 суткам у мышей *Acomys* также наблюдали процессы репаративной регенерации краев раны. К 30 суткам дефект ушной раковины был полностью закрыт. На гистологических срезах наблюдали эластический хрящ, который заполнял область дефекта, но имел морфологические отличия от хряща неповрежденной ушной раковины. Во вновь образованном хряще были видны мелкие упорядоченные хондроциты с небольшими лакунами, сформированной надхрящницей и обилием эластического матрикса.

После полного удаления ушной раковины у мышей группы *Acomys* к 3 месяцу наблюдали восстановления

1/3 утраченных тканей. В контрольной группе отмечали только эпителизацию культи ушной раковины.

Таким образом, у мышей Balb/c дефект ушной раковины не закрывается. У мышей *Acomys* ткани аналогичного дефекта восстанавливаются, причем мы обнаружили процессы репаративного хондрогенеза, ведущие к полному восстановлению целостности и структуры хрящевой ткани. Работа выполнена в рамках Программы академического стратегического лидерства Казанского Федерального Университета (Приоритет-2030), проект поддержан Российской Федерацией в лице Министерства Науки и Высшего Образования (№ 075-15-2021-1344).

Литература:

1. Trengove A., Di Bella C., O'Connor A. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2022. V. 28. № 1. P. 114–128
2. Iwaniak P., Dobrowolski P., Tomaszewska E. et al. J. Dev. Orig. Health. Dis. 2016. V. 7. № 3. P. 298–305.
3. Maden M., Varholick J.A. Development. 2020. V. 147. № 4. Art. № 167718.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ ИГЛИСТЫХ МЫШЕЙ

А.А. Билялова¹, Н.С. Филатов¹, Д.Д. Филимошина¹, А.И. Билялов^{1,2}, А.А. Титова¹, Л.Р. Гатауллина¹, Е.И. Шагимарданова¹, А.П. Киясов¹, О.С. Козлова¹, А.А. Несмелов¹, О.А. Гусев^{1,3,4}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия

³ Университет Джунтендо, Токио, Япония

⁴ НМИЦ эндокринологии, Москва, Россия

e-mail: Alinayakupova96@yandex.ru

Ключевые слова: Acomys, иглистая мышь, надпочечник.

Колючие мыши или мыши рода *Acomys*. являются одними из немногих представителей класса млекопитающих с повышенной способностью к регенерации, в частности, к восстановлению функциональности тканей без развития рубцевания [1]. Кроме того, мыши рода *Acomys* имеют особенности клеточного и тканевого строения надпочечника, не присущие грызунам.

Целью данной работы является описание особенностей строения тканей надпочечника акомисов и их детальное сравнение с надпочечниками мышей.

Исследование по изучению особенностей строения надпочечника проводили на 2 группах животных: самцы мышей *Acomys cahirinus* (n=4), и самцы мышей линии Balb/c (n=4). После обезболивания «Zoletil 100» в расчете 7 мг на 1 кг массы тела хирургическим способом извлекали надпочечники для дальнейшего гистологического анализа.

При сравнении послойного строения тканей надпочечников мышей рода *Acomys* и мышей линии Balb/c были выявлены значительные отличия. Группы животных различаются по характеру зональности коры надпочечников. У мышей линии Balb/c кора надпочечник содержит клубочковую и пучковую зону, однако отсутствует сетчатая зона, вместо которой предположительно располагается X-зона, которая, по данным литературы, является аналогом фетальной коры у человека [2, 3, 4]. В отличие от лабораторных мышей, кора надпочечников мышей рода *Acomys* содержит сетчатую зону и продуцирует как кортизол (у лабораторных мышей и крыс основным

глюкокортикоидом является кортикостерон), так и андрогены. В этом отношении надпочечники мышей *Asomys* имитируют надпочечники человека.

В виду того, что мышцы рода *Asomys* имеют строение тканей надпочечника схожее с человеком, в будущем они могут применяться в качестве лучшей модели для изучения заболеваний надпочечника. Однако для этого необходимо будет провести дополнительные валидационные исследования с использованием методов иммуногистохимии и транскриптомного анализа.

Работа выполнена в рамках Программы академического стратегического лидерства Казанского Федерального Университета (Приоритет-2030), проект поддержан Российской Федерацией в лице Министерства Науки и Высшего Образования (№ 075-15-2021-1344).

Литература:

1. Maden M., Varholick J.A. Development. 2020. V. 147. № 4. dev167718.
2. Morohashi K., Zubair M. Mol Cell Endocrinol. 2011. V. 336 № 1. P. 193–197.
3. Hirokawa N., Ishikawa H. Z Anat Entwicklungsgesch. 1974. V. 144 № 1. P. 85–100.
4. Liat H., Felix B., Steffen K., Margalit K. Endocrinology. 2007. V. 148 № 3. P. 976–988.

ПИОНЕРСКИЕ РАБОТЫ Г.П. ПИНАЕВА ПО СОЗДАНИЮ КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

М.И. Блинова, Н.А. Михайлова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: mira.blinova@mail.ru

Ключевые слова: коллекция клеточных культур, биомедицинские клеточные продукты, ожоги, трофические язвы, внеклеточный матрикс.

Георгий Петрович Пинаев (1929–2013), д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки (1985), заведующий Отделом клеточных культур Института цитологии РАН, внес значительный вклад в развитие клеточной биологии, включая исследование биологии клетки в культуре и влияния белков внеклеточного матрикса на функциональную активность клеток. Особое значение имели работы, инициированные и поддержанные Г.П. Пинаевым, по созданию белковых и синтетических матриц-носителей для 3D культивирования клеток и созданию (на их основе) клеточных продуктов для восстановления поврежденных тканей человека. Работы Г.П. Пинаева основывались на глубоких фундаментальных знаниях, умении комплексно решать научные и научно-организационные задачи, необходимости практического использования полученных результатов фундаментальных исследований.

Научная карьера Г.П. Пинаева началась с биохимических исследований механизмов биологической подвижности, что привело к необходимости использования в работе культивируемых клеток. Первые навыки культуральных работ он получил за рубежом и активно внедрял полученные знания в нашей стране. В это время в стране отсутствовали коллекция клеточных культур и вся инфраструктура, обеспечивающая эту область деятельности: необходимые сыворотки и культуральные среды, лабораторная посуда и оборудование. Вопросы

о необходимости организации коллекции и инфраструктуры были поставлены Г.П. Пинаевым перед Отделением физико-химических наук АН СССР. В результате, в 1978 году, был организован Междудеятельственный научно-технический совет по проблемам молекулярной биологии и молекулярной генетики при Госкомитете Совета Министров СССР по науке и технике (под руководством академика Ю.А. Овчинникова) и сформирована Комиссия по клеточным культурам под руководством Г.П. Пинаева. Было принято решение о необходимости создания Всесоюзной коллекции клеточных культур. Для осуществления взаимодействия специалистов была создана Межрегиональная общественная научная организация «Ассоциация специалистов по клеточным культурам». Г.П. Пинаев был бессменным президентом Ассоциации.

В задачу Комиссии входило также задание по созданию в стране отечественной инфраструктуры, включающей разработку питательных сред, производство эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, производство пластиковой посуды и специализированного оборудования.

Клеточная биология и биотехнология стали основными направлениями исследований, проводимых в Отделе клеточных культур ИЦ РАН под руководством Г.П. Пинаева. В 1991 г. по Гособоронзаказу ГВМУ МО СССР была начата разработка первого в стране биомедицинского клеточного продукта для заживления критических и сверхкритических ожогов — был создан «Эквивалент дермальный, ЭД», разрешенный к применению в клиниках в 2006–2011 гг. В настоящее время в ИЦ РАН активно продолжают работы по созданию клеточных продуктов для регенеративной медицины.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ, В МСК IN VITRO ПРИ ПОНИЖЕННОМ СОДЕРЖАНИИ КИСЛОРОДА

П.И. Бобылёва, Ю.В. Рудимова

ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

e-mail: blastoblast@gmail.com

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гипоксия, экспрессия генов, эпигенетическая регуляция

Понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе регуляции функций мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК), является ключом к их успешному клиническому применению, которое включает предварительную подготовку клеточного материала с целью получения продукта с оптимальными для конкретных терапевтических целей свойствами. Хорошо известен факт существования клеток в тканевой нише при парциальном давлении O_2 , значительно более низком, чем атмосферное, что значительно модифицирует свойства клеток. В основе регуляции клеточного ответа на любое воздействие лежат разнообразные эпигенетические механизмы. И наша задача состояла в том, чтобы провести скрининг изменения экспрессии генов, участвующих в эпигенетической регуляции, в ответ на различный уровень оксигенации.

МСК человека культивировали в течение 72 ч при 1%, 3%, 5% и 20% O_2 . Из образцов клеток получали тотальную РНК, амплифицировали с помощью набора Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, CLIA)

и проводили гибридизацию на микрочипах Human-Ref-12 (Illumina, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения GenomeStudio (Gene Expression Module v1.5.4, Illumina). Для оценки экспрессии генов, участвующих в эпигенетической регуляции, использовали базу данных www.epifactors.autosome.org.

Наибольший эффект гипоксического культивирования наблюдался при 3% O₂: из 34686 генов изменялась экспрессия 4707 генов, при 1% — 3423 генов, при 5% — 2971 генов. Наиболее количество генов, участвующих в эпигенетической регуляции функций клетки, изменяло транскрипционную активность также при 3% O₂ — 180 генов; при 1% — 101 ген; при 5% — 79 генов. Наибольшую долю среди них составляли гены, мишенями которых являются гистоны. В меньшем количестве были представлены гены, взаимодействующие с хроматином/ДНК. Самую малую группу составляли гены, воздействующие на РНК.

В условиях 3% O₂ по сравнению с нормоксией снижалась представленность генов, участвующих в регуляции гистонов, и увеличивалась — для генов, регулирующих хроматин/ДНК, а также РНК. Культивирование при 1% и 5% O₂ наоборот снижало по сравнению с 20% O₂ представленность генов, регулирующих РНК; для генов, регулирующих хроматин/ДНК — представленность снижалась (при 1% O₂) либо не изменялась (при 5% O₂); для генов, регулирующих гистоны — повышалась (при 1% O₂) или не изменялась (при 5% O₂).

Таким образом, при 3% O₂ МСК отвечают изменением экспрессии большего количества генов по сравнению с 1% и 5% O₂, при этом задействовано больше генов, участвующих в эпигенетической регуляции. Представленность генов, воздействующих на различные мишени в эпигенетическом ответе МСК на разный уровень гипоксии, может отличаться в зависимости от уровня O₂.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00749

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК К АУТОЛОГИЧНЫМ НК-КЛЕТКАМ ОБУСЛОВЛЕНА ДИСБАЛАНСОМ ЭКСПРЕССИИ ЛИГАНДОВ К АКТИВИРУЮЩИМ И ИНГИБИРУЮЩИМ РЕЦЕПТОРАМ НК-КЛЕТОК

М.Е. Богомякова^{1,2}, Е.К. Секретова^{1,2}, К.С. Ануфриева¹, П.О. Хабарова², А.Н. Казакова¹, П.А. Бобровский¹, Т.В. Григорьева³, А.Н. Богомазова¹, М.А. Лагарькова^{1,2}

¹ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Казанский федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: margbog@rcpctm.org

Ключевые слова: аутологичные ИПСК, дифференцировка, HLA-I, бета-2-микроглобулин, иммуногенность, иммунотолерантность, НК-клетки

Клеточная терапия на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в настоящее время проходит стадию клинической апробации. Использование пациент-специфических ИПСК теоретически может обеспечить персонализированную терапию благодаря их главному преимуществу — иммунотолерантности.

Однако некоторые группы исследователей сообщают, что aberrantная экспрессия генов, сопровождаемая изменениями протеома и образованием неоантигенов, может приводить к распознаванию производных ИПСК аутологичными Т-клетками [1,2]. Между тем, возможность активации НК-клеток ранее не рассматривалась.

Наше исследование посвящено изучению НК-клеточного ответа при сокультивировании с различными производными ИПСК. Используя изогенную клеточную модель, состоящую из исходных фибробластов и фибробластоподобных производных (iPS-fibro), мы показали, что клетки, дифференцированные из ИПСК, вызывают высокий уровень дегрануляции и цитотоксичности НК-клеток. В то же время производные ИПСК с нокаутом гена *B2M*, лишенные молекул HLA-I, не вызывали дополнительного увеличения активации НК-клеток. С помощью транскриптомного анализа мы выявили значительный дисбаланс НК-клеточных лигандов в iPS-fibro. По сравнению с исходными соматическими клетками в производных ИПСК повышена экспрессия лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D и снижена экспрессия молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов НК-клеточных рецепторов. Причиной недостатка ингибирующих сигналов в iPS-fibro может быть недостаточная зрелость клеток, дифференцированных из ИПСК. Длительное культивирование и пассирование iPS-fibro или предварительная обработка клеток IFN γ повышает экспрессию HLA I класса, что возвращает баланс лигандов в равновесное состояние и снижает дегрануляцию и цитотоксичность НК-клеток. В этой связи неполная иммунологическая толерантность к аутологичным клеткам, полученным из ИПСК, должна приниматься во внимание при использовании клеточных продуктов, дифференцированного из ИПСК, в целях регенеративной медицины. Работа поддержана грантами РФФИ #20-315-90041 и #19-29-04113-мк.

Литература:

1. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. Nature. 2011. V. 474(7350). P. 212–215.
2. Zhao T., Zhang Z.N., Westenskow P.D. et al. Cell Stem Cell. 2015. V. 17(3). P. 353–359.

СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ МОДИФИКАЦИИ КУЛЬТУРЫ МСК ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА

М.С. Божокин^{1,2}, С.А. Божкова², Ю.В. Сопова^{1,3}, М.Г. Хотин¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² НМИЦ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

³ Центр трансгенеза и редактирования генома Института трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: writeback@mail.ru

Ключевые слова: гиалиновый хрящ, клеточно-инженерная конструкция, невирусная модификация клеток, фотобиостимуляция, TGF- β 3, трансфекция

Гиалиновый хрящ обладает ограниченными регенеративными способностями [1]. Применение клеточно-инженерных конструкций (КИК) с модифицированными клетками является одним из перспективных методов его восстановления [2]. Ключевой этап разработки

подобной технологии состоит в выборе метода модификации клеточной культуры [3]. В работе проведено сравнение эффективности применения принципиально различных невирусных методов модификации первичной культуры мезенхимных стромальных клеток (МСК) крысы по их влиянию на дифференцировку МСК в хондрогенном направлении.

В качестве агентов для модификации МСК использовали: рекомбинантный белок TGF- β 3, фотобиостимуляцию низкоинтенсивным лазерным излучением 632,8 нм, а также экспрессионную плазмиду с геном *tgf β 3*. Трансфекцию проводили при помощи препарата Lipofectamin3000. При помощи проточной цитометрии на приборе BD FACS Aria III определяли: эффективность трансфекции и % жизнеспособных клеток, из чего делали вывод о цитотоксичности различных методов. Анализ эффективности модификации клеточной культуры проводили: по изменению экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой в хондрогенном направлении — *sox9*, *tgf β 3*, *acan*, *col2a1*.

Эффективность трансфекции МСК плазмидой была <5%, а цитотоксичность высокой >75%. Не наблюдали цитостатического при использовании фотобиостимуляции или добавлении к культуре рекомбинантного белка. При этом, модификация этими методами оказывала выраженное действие на хондрогенную дифференцировку МСК, значительно увеличивая экспрессию основных генов хондрогенеза (*col2a1*>60x, *sox9*>80x, *tgf β 3*>1000x).

Таким образом, использование белка TGF- β 3 или фотобиостимуляции являются наиболее перспективными методами для модификации МСК при клеточной инженерии гиалинового хряща ввиду своей эффективности и отсутствия цитотоксичности.

Литература:

1. Carballo C.B., Nakagawa Y., Sekiya I., Rodeo S.A. Clin. Sports Med. 2017, 36, p.413–425.
2. Roseti L., Desando G., Cavallo C., et al. Cells, 2019, 8, p.1305.
3. Shestovskaya M.V., Bozhkova S.A., Sopova J.V. et al. *Biomedicines*, 2021, 9, p. 1666.

МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В РЕПРОГРАММИРОВАНИИ КЛЕТОК ОПУХОЛЕВОЙ СТРОМЫ

**В.С. Бойченко¹, П.С. Климович^{1,2},
А.А. Щипова¹, К.А. Рубина¹, Е.В. Семина¹**

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

² Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦК им. Е.И. Чазова, Москва, Россия

e-mail: beroniko99@gmail.com

Ключевые слова: урокиназный рецептор, урокиназная система, система активаторов плазминогена, опухолевая строма, внеклеточные везикулы, экзосомы, нейробластома

Высокий уровень экспрессии урокиназы и ее рецептора (uPAR) связан с опухолевой прогрессией и риском развития метастаз, что позволяет рассматривать урокиназную систему как перспективную мишень для подавления роста опухоли [1]. Клетки опухоли способны изменять свое микроокружение за счёт образования внеклеточных везикул, содержащих сигнальные белки, микроРНК и транскрипционные факторы, вызывающие ее химиорезистентность и метастазирование. Высокие уровни экспрессии белков урокиназной системы

в экзосомах опухолевых клеток позволяют предполагать их роль в перерождении окружающей стромы и активации метастазирования, опосредованной внеклеточными везикулами [2].

В работе изучали влияние везикул опухолевых клеток на изменение транскрипционной активности фибробластов. Собирали везикулы с клеток мышшиной нейробластомы Neuro 2A дикого типа (N2A WT) и N2A с подавленной экспрессией uPAR (N2A-Plaur^{-/-}), сокультивировали с фибробластами 48 часов, после чего проводили оценку уровня экспрессии мРНК маркеров активированной стромы (MMP2, MMP9, IL6, MCP1, mTOR, p53).

Было обнаружено, что добавление везикул от N2A WT достоверно повышает экспрессию мРНК mTOR, MMP2 и p53 в мышшиных фибробластах по сравнению с контрольной средой (p<0,05), тогда как сокультивирование с везикулами от N2A-Plaur^{-/-} такого эффекта не вызывает. В тоже время везикулы от N2A-Plaur^{-/-} подавляли экспрессию MMP9 по сравнению с контрольной средой (p<0,05), везикулы же дикого типа не оказывали такого влияния. Оба типа везикул повышали экспрессию генов IL6 и MCP1 и достоверно не отличались.

Таким образом, можно предположить, что нокаут гена Plaur приводит к изменению состава везикул, что влияет на транскрипционную программу фибробластов и понижает проопухолевое действие везикул. Это открытие привлекает внимание к дальнейшему изучению механизмов участия урокиназной системы в перепрограммировании клеток стромы опухоли. Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ No 20-015-00186\20.

Литература:

1. Montuori N., Pesapane A., Rossi F. et al. *Translational Medicine at UniSa*. 2016. № 15. P. 15–21.
2. Porcelli R., Guida M., De Summa S., Fonte R. et al. *Immunotherapy Cancer*. 2021. № 9. Art. № e002372

УСТРОЙСТВО ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ТЕРМИЧЕСКОГО ОЖОГА

**В.В. Болтовская¹, В.А. Болтовский²,
А.В. Болтовский³**

¹ Биотехнологический центр «БиоТех» СамГМУ, Самара, Россия

² Кафедра педиатрии ИПО СамГМУ, Самара, Россия

³ Самарский областной клинический онкологический диспансер, Самара, Россия

e-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru

Ключевые слова: термический ожог, лабораторные животные, полезная модель, моделирование термического ожога.

Целью создания полезной модели является моделирование стандартизированного термического ожога необходимой глубины с заранее заданной площадью, с точным ее вычислением, а также возможностью дозирования повреждающего фактора по времени и по температуре.

Эта цель достигается тем, что корпус выполнен в виде цилиндрической емкости, заполняемой водой, плоское дно которой выполняет функции контактного ожогового элемента, а нагреватель выполнен в виде трубчатого электронагревательного элемента, причем корпус выполнен из термостойкого светопрозрачного материала, корпус снабжен рукояткой. Контроль за температурой осуществляется при помощи термометра, а время

воздействия-секундомером. Для фиксации лабораторного животного имеется приспособление. Устройство используют следующим образом:

Наркоз животному проводят при помощи рометара и золетила. С участка кожи, на котором будет проведено моделирование ожога, полностью удаляют шерсть. Лабораторное животное фиксируют за лапы при помощи ленточных фиксаторов.

Корпус заполняют водой, размещают в нагреватель и нагревают до заданной температуры. Контроль за температурой осуществляют термометром, время воздействия фиксируют секундомером. Температура 96° сохраняется в течение 1 мин.

Экспериментальным путем была выявлена зависимость степени ожога от времени действия температурного фактора [1].

Площадь ожога выражается в процентах ко всей поверхности тела. Для расчета площади поверхности тела у белых крыс Lee (1929) предложил модификацию формулы Мее-Рубнера [2]:

$$S = K \cdot W$$

Где S — поверхность тела в квадратных сантиметрах,
 K — коэффициент, равный 12,54,
 W — вес животного в граммах.

Литература:

1. Болтовская В.В. Патоморфология раневого процесса в зоне кожи в условиях применения низкоинтенсивного электромагнитного излучения. Диссертация канд. мед. наук. Самара: Самарский гос.мед. ун-т, 2006. 133с.
2. Кочетыгов, Н.И. О способах воспроизведения термических ожогов в эксперименте / Н.И. Кочетыгов. JL: ВМОЛИА им. С.М. Кирова, 1964. — 46 с.

ФТОРПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

Е.Н. Больбасов¹, В.М. Бузник², Г.Ц. Дамбаев³, Д.Е. Кульбакин⁴, Е.Ю. Варакута³

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

⁴ НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия

e-mail: Ftoroplast@tpu.ru

Ключевые слова: Фторполимеры, Мембраны, Композиты, Электроформование.

Высокая биологическая совместимость фторполимеров определяет их широкое применение в качестве имплантатов в реконструктивно-восстановительной хирургии. В настоящее время на основе фторполимеров изготавливают искусственные кровеносные сосуды; желчные протоки; искусственные клапаны сердца; имплантаты для пластической хирургии; мембраны для стоматологии; имплантаты для травматологии и ортопедии [1]. Особое место среди фторполимеров занимают материалы, обладающие сегнето- и пьезоэлектрическими свойствами в силу перспектив создания на их основе «умных» имплантатов способных стимулировать процессы регенерации поврежденных тканей, посредством

собственной электрической активности без использования батарей или электродов.

В работе представлены результаты исследований по изучению возможности использования отечественного электроактивного полимерного материала — сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) в качестве биологически активного полимера для изготовления мембран для регенерации слизистых оболочек ротовой полости, мембран для заживления гнойных ран, 3D имплантатов для восстановления твердых тканей в области головы и шеи, интрамедуллярных имплантатов для лечения врожденных патологий опорно-двигательного аппарата у детей и разработки искусственных сосудов. В сравнительном аспекте представлены результаты исследований физико-химических и медико-биологических свойств сегнетоэлектрических полимерных мембран, сформированных методами электро- и аэродинамического формования. Дана оценка физико-химических свойств и клинической эффективности сегнето- и параэлектрических полупроницаемых фторполимерных мембран. Представлены результаты по модифицированию поверхности фторполимерных ВДФ-ТеФЭ мембран для увеличения биосовместимости.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00171.

Литература:

1. Адаменко Н.А., Больбасов Е.Н., Бузник В.М. и др. в кн.: Фторполимерные материалы. Под ред. В.М. Бузника Томск: Изд-во НТЛ. 2017. 600 с.

ИНСУЛИН-ЗАВИСИМАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

А.Д. Бондарев, П.А. Тюрин-Кузьмин

Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: khal_007@yahoo.com

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, инсулин, фосфолипаза С, старение, клеточное старение, метаболический синдром

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой важнейшую популяцию постнатальных стволовых клеток, характеризующуюся потенциальностью к дифференцировке в клетки костной, хрящевой и жировой тканей. Известно, что и старение, и сахарный диабет связаны с дисфункцией жировой ткани, способствуя развитию инсулиновой резистентности [1]. Известно также о схожих функциональных изменениях в МСК из жировой ткани при ожирении и метаболическом синдроме (MetC) [2, 3], и о накоплении сенесцентных клеток при развитии ожирения. Кроме того, на модели свиньи было показано, что при MetC в МСК наблюдаются изменения в экспрессии мРНК компонентов инсулиновой сигнализации [4]. При развитии инсулинорезистентности происходит снижение или полное подавление инсулин-зависимой активации PI3K/Akt-зависимой сигнализации и часто происходит подавление MAPK/Erk1/2 сигнального каскада. В данной работе мы решили проверить, изменяется ли кальциевая сигнализация, активируемая инсулиновым рецептором при развитии инсулинорезистентности. Используя метод прижизненной флуоресцентной микроскопии с кальциевым биосенсором Fluo-8,

мы провели серию экспериментов по определению особенностей инсулиновой сигнализации в МСК из жировой ткани у инсулинорезистентных, пожилых и здоровых доноров. Мы выявили, что МСК из жировой ткани инсулинорезистентных и сенесцентных доноров отвечает на инсулин кальциевыми осцилляциями; клетки раннего пассажа здорового донора отвечали низкоамплитудным, но продолжительным по времени приростом внутриклеточного уровня кальция. Ответы у пожилых и инсулинорезистентных доноров были существенно более выражены. Ингибиторный анализ с использованием ингибитора фосфолипазы C (PLC) показал, что инсулиновая сигнализация в МСК инсулинорезистентных и пожилых доноров протекает по PLC-независимому механизму, в отличие от клеток молодого донора на ранних пассажах. Наши эксперименты показали, что при развитии инсулинорезистентности наблюдается усиление инсулин-зависимой кальциевой сигнализации.

Литература:

1. Palmer AK, Gustafson B, Kirkland JL, Smith U. *Diabetologia*. 2019;62(10):1835–1841.
2. Louwen F, Ritter A, Kreis NN, Yuan J. *Obes Rev*. 2018;19(7):888–904.
3. Kornicka K, Houston J, Marycz K. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(3):337–345.
4. Conley SM, Zhu XY, Eirin A, et al. *Gene*. 2018; 644:101–106.

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИМБА ПОД ВЛИЯНИЕМ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИМБА РОГОВИЦЫ

Н.А. Бондаренко¹, М.А. Суровцева¹, И.И. Ким¹, А.П. Лыков¹, И.А. Исаков², А.Н. Трунов², В.В. Черных², О.В. Повещенко¹

¹ НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза им. академика С.Н. Федорова, 630096, Новосибирск, Россия

e-mail: bond802888@yandex.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, лимб, лимбальные эпителиальные стволовые клетки, кондиционная среда, кератоциты, фибробласты роговицы, пролиферация, миграция

Лимб представляет собой переходную зону роговицы глаза и считается местом, где находятся лимбальные стволовые клетки [1]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) лимба расположены в «нише» и питают лимбальные эпителиальные стволовые клетки (ЛЭСК [2]). Нередко возникает дефицит ЛЭСК из-за химических и термических ожогов, физического повреждения роговицы, а также при врожденных заболеваниях [3]. В связи с этим считается, что возникновение лимбальной недостаточности связано или с функциональной несостоятельностью ЛЭСК, или с нарушением функциональной активности МСК лимба. Поэтому большой интерес представляет собой изучение взаимодействия МСК лимба с ЛЭСК.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение влияния кондиционной среды от ЛЭСК на функциональную активность МСК лимба человека.

МСК и ЛЭСК получали из области лимба энуклеированных по плановым медицинским показаниям глаз. МСК культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FCS. ЛЭСК культивировали на амниотической мембране в стандартных условиях в среде CECBM (Corneal Epithelial Cell Basal Medium) без FCS. Интенсивность пролиферации МСК лимба оценивали в МТТ тесте под влиянием кондиционной среды. Миграционная активность МСК лимба была исследована в тесте закрытия раны с помощью микроскопа Axio Observer. Продукцию ФНО- α , BDNF, SDF-1 α , виментина, общего коллагена, фибронектина, ICAM-1, IGF определяли методом ИФА в соответствии с рекомендациями производителя.

Показано, что кондиционная среда от ЛЭСК статистически значимо снижает пролиферативную активность МСК на 38% по сравнению с контролем. В тесте по оценке миграционной активности МСК лимба установлено, что под влиянием кондиционной среды от ЛЭСК миграции клеток не наблюдается на всем протяжении эксперимента (48 ч), закрытие раны не происходит. В кондиционной среде ЛЭСК обнаружена повышенная концентрация VEGF, TNF- α , пониженная концентрация BDNF, виментина, фибронектина.

Полученные данные вносят вклад в понимание взаимодействия клеток в нише лимба, необходимого для поддержания клеточного гомеостаза в лимбе роговицы.

Литература:

1. Kinoshita S., Adachi W., Sotozono C. et al. *Prog. Retin. Eye Res*. 2001. Vol. 20, P. 639–673.
2. Jin H., He M., Liu H. et al. *Cornea*. 2019. Vol. 38. P. 446–453.
3. Pellegrini G., Rama P., Di Rocco A, et al. *Stem Cells*. 2014. Vol.32, P. 26–34.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕГИЛИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА-1 НА КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ КОНЬЮНКТИВЫ

Н.А. Бондаренко, Н.А. Кихтенко, О.В. Повещенко, М.А. Суровцева., И.И. Ким, П.Г. Мадонов

НИИКЭЛ-филиал ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: bond802888@yandex.ru

Ключевые слова: интерферон, интерферон лямбда, пегилирование, конъюнктивит человека, цитотоксичность, пролиферация; клетки нормальной конъюнктивы

На сегодняшний день отсутствуют эффективные универсальные противовирусные препараты для лечения вирусных заболеваний передней поверхности глаза. Известно, что интерферон- λ (ИНФ- λ) играет важную роль во врожденной противовирусной, противогрибковой защите слизистых [1]. В исследованиях продемонстрировано, что ИНФ- λ регулирует функциональную активность нейтрофилов для снижения воспаления роговицы, вызванного вирусом простого герпеса. Также при нанесении ИНФ- λ на роговицу наблюдается подавление инфильтрации иммунными клетками роговицы, что значительно снижает воспаление [2]. Модификация белковых молекул нативных препаратов позволяет значительно улучшить их фармакодинамические свойства. Поэтому представляется актуальным создание противовирусных препаратов для офтальмологии на основе пегилированного интерферона- λ 1 (ПЭГ ИНФ- λ 1).

В связи с этим целью работы было оценить цитотоксическое влияние рекомбинантного человеческого ИФН-λ1 и его пегилированной формы, на клетки конъюнктивы человека.

ИФН-λ1 использовали в концентрациях 37 мкг/мл, 370 мкг/мл и ПЭГ ИФН-λ-1, полученного методом электронно-лучевой иммобилизации, в концентрациях 42 мкг/мл, 420 мкг/мл. Оба препарата произведены в АО «СЦФБ» (Россия). Степень чистоты препаратов > 97%. Для культивирования использовали культуру клеток нормальной конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4. Цитотоксическое действие препаратов оценивали в МТТ-тесте. Пролиферативную активность клеток изучали на клеточном анализаторе xCELLigence System (Roche Applies Science, США).

По результатам МТТ-теста жизнеспособность клеток конъюнктивы под влиянием ИФН-λ-1 в концентрации 37 мкг/мл и ПЭГ ИФН-λ в концентрации 42 мкг/мл была сопоставимой и составила 92%, 90%, соответственно. Десятикратное увеличение концентрации ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ1 снижало жизнеспособность клеток на 15–20%. Также пролиферативная активность клеток конъюнктивы после добавления ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ была сопоставима с пролиферативной активностью клеток в контроле в течение 48 часов наблюдения в режиме реального времени.

Таким образом, препараты ИФН-λ-1 и ПЭГ ИФН-λ-1 не обладают выраженной цитотоксичностью на клетки конъюнктивы человека и могут считаться безопасными в качестве активных фармацевтических субстанций для разработки лекарственных препаратов в лечении вирусных поражений конъюнктивы.

Литература:

- Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Nat. Rev. Immunol. 2019. Vol. 19. N.10. P. 614–625.
- Antony F., Pundkar C., Sandey M et al. Immunol. 2021. Vol. 206. N.8. P. 1866–1877.

ПРИМЕНЕНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОСОВОГО ОТДЕЛА ГОРТАНИ

Н.А. Бояринова

ЦГМА ДПО ФГБУ Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

e-mail: boyarinova.natasha98@yandex.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, рубцовые повреждения голосовых складок.

Острые и хронические воспаления гортани; травмы различной этиологии, в том числе ятрогенные; ожоги — все это, в итоге, становится причиной формирования рубцов, которые приводят к нарушению нормальной смыкания голосовых складок и стенозу гортани. В результате возникает стойкое нарушение голосовой и дыхательной функций [1]. К сожалению, существующее многообразие методик по реабилитации голосовой функции не приводит к полному ее восстановлению и регрессу нарушений в структуре голосовых складок [2].

Целью данной работы является обзор литературных данных для изучения возможностей стволовых клеток в восстановлении структуры и функций голосовых складок при их повреждении.

Были проанализированы статьи за период с 2010 по 2021. Для поиска использовалась база данных

Medline (Pubmed). Статьи представляли собой преимущественно доклинические исследования на животных.

Рубцовая ткань представляет собой хаотично расположенные пучки коллагеновых волокон. В результате пространственной дезорганизации экстрацеллюлярного матрикса собственной пластинки слизистой оболочки и дисбаланса белков, голосовая складка, представленная такой тканью, не может выполнять свои функции. Стволовые клетки способны увеличивать регенерацию голосовых складок, приводя к образованию ткани, по морфологическим и биомеханическим свойствам приближающейся к строению нативной [3]. Стволовые клетки ингибируют профибротические эффекты фибробластов, усиливают экспрессию фактора роста фибробластов, фактора роста гепатоцитов, нормализуют экспрессию генов проколлагена, TGF β1, ИЛ-1β, ИЛ-17β и фактора некроза опухоли, оказывая тем самым антифибротическое действие и моделируя воспалительную реакцию, чем усиливают регенерацию голосовых складок и улучшают их вибрационные свойства [4].

Клеточная терапия демонстрирует перспективу в репарации структуры и функций голосового отдела гортани. Стволовые клетки эффективно восстанавливают поврежденные голосовые складки, приближая их строение к нативным структурам.

Литература:

- G. de Bonnecaze, Laryngoscope, 2016.
- V.M. Svistushkin, Vestn. RAMN, 2016.
- V.L. Wingstrand, PLOS One, 2016.
- Y.-M. Kim, Ann Otol Rhinol Laryngol, 2013.

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР КАЛЬЦИФИКАЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ — КРЕНИГАЦЕСТАТ (LY3039478)

Н.В. Боярская¹, О.С. Качанова¹, А.А. Лобов¹, А.А. Шишкова¹, Б.Р. Зайнуллина², А.А. Пичугин¹, А.А. Филиппов¹, В.Е. Успенский¹, А.Б. Малашичева¹

¹ ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

e-mail: nad.vb@yandex.ru

Ключевые слова: кальцификация сердечно-сосудистой системы, ингибитор кальцификации

Кальцификация сердечно-сосудистой системы может происходить в результате осложнений различных заболеваний или являться самостоятельной патологией. Значительную часть этой патологии занимает кальцинирующая болезнь аортального клапана (КБАК). Заболевание смертельно и единственным вариантом лечения является хирургическая замена клапана.

Основной развития КБАК является остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток клапана (ИКК). В предыдущих исследованиях показана роль сигнального пути Notch как в развитии КБАК, так и в остеогенной дифференцировке ИКК. Таким образом использование ингибиторов передачи сигналов Notch в ИКК может рассматриваться как перспективный подход для лечения КБАК.

Цель данной работы — тестирование ингибиторов сигнального пути Notch для подавления остеогенной дифференцировки первичный культур ИКК, полученных

от пациентов с КБАК. Выделенные ИКК из операционного материала с КБАК были стимулированы в сторону остеогенной дифференцировки с добавлением выбранных ингибиторов Notch: СВ-103 или кренигацестата, и без них. Степень дифференцировки исследовали с помощью ПЦР в реальном времени, анализировали уровень экспрессии маркеров остеодифференцировки. А также измеряя уровень кальцификации с помощью окрашивания Ализариновым красным. Цитотоксичность изучали с помощью МТТ-теста. Для понимания молекулярных механизмов при использовании ингибиторов остеогенной дифференцировки проводили протеомный анализ с помощью скорострельной протеомики с ионной подвижностью на платформе TimToF Pro.

Кренигацестат в концентрациях 50–100 нМ полностью подавляет остеогенную дифференцировку и не оказывает очевидного цитотоксического действия. Ингибитор СВ-103 не оказывает значимого ингибирующего воздействия на остеодифференцировку.

При помощи протеомного анализа были найдены потенциальные мишени кренигацестата. Нами было выявлено изменение экспрессии белков, ассоциированных с развитием скелета, например, фибриллина 1, и белков, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, например, LMOD1. Однако функция большинства из обнаруженных белков не была описана в контексте КБАК ранее, что свидетельствует о недостаточном понимании механизма действия кренигацестата и фундаментальных механизмов остеогенной дифференцировки ИКК.

Другими исследователями кренигацестат был изучен в контексте лечения опухолевых клеток *in vitro*, в концентрациях схожих с нашими от 100нМ до 10мкМ [1]. И был проверен в клинических испытаниях в пероральной форме с дозировками 25, 50 и 75 мг с оптимальной пероральной дозировкой 50 мг и максимальной дозой 100 мг [2]. Он обладает контролируемым токсическим действием без опасных побочных эффектов.

Таким образом, кренигацестат эффективно подавляет остеогенную дифференцировку ИКК, мы знаем эффективную дозировку кренигацестата для ингибирования остеогенной дифференциации ИКК *in vitro* и интервал дозирования, который безопасен для людей при пероральной или внутривенном введении. Мы предполагаем, что кренигацестат будет эффективен в клинических испытаниях против кальцификации сосудов, но все же считаем, что необходимы дополнительные эксперименты с тканями (кальцинированный аортальный клапан) и моделями животных. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации (номер соглашения 075-15-2020-901).

Литература:

1. Mancarella S., Serino G., Dituri F. et al. Cell Death Differ. 2020. 27(8):2330–2343
2. Yuen E., Posada M., Smith C. et al. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2019. 83 (3): 483–92.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ И АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПРИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

В.А. Брунчук, Т.А. Астрелина, А.А. Расторгуева, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Никитина, В.А. Брумберг, Д.Ю. Усупжанова, Е.Е. Ломоносова, Н.В. Соколова, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, А.С. Самойлов

ФГБУ ГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, Россия

e-mail: brunya2008@yandex.ru

Ключевые слова: местные лучевые поражения, амниотическая мембрана, децеллюляризация, кондиционированная среда

Актуальность: при местных лучевых поражениях (МЛП) большой площади не всегда удается получить трансплантаты кожи для укрытия в нужном объеме. Одним из перспективных методов лечения МЛП является применение децеллюляризованной амниотической мембраны человека (АМ), служащей альтернативным источником укрывного материала для лечения различных повреждений организма [1–2].

Цель: изучить эффективность комбинированной терапии МЛП с применением АМ и лиофилизата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека (КС).

Материалы и методы: 28 лабораторных животных (крысы Wistar, самцы с массой $230,0 \pm 20,0$ граммов). Животные были рандомизированы случайным образом и разделены на 4 группы ($n=7$) в зависимости от вида проводимой на 21 сутки терапии после моделирования МЛП:

К — контроль без терапии;

А — фиксация АМ узловыми швами к краям язвенной поверхности;

ЛП — интрадермальное введение КС вокруг зоны поражения;

А+ЛП — интрадермальное введение КС и последующая фиксация АМ к краям язвенной поверхности МЛП.

Каждое животное наблюдали 1 раз в неделю до 112 суток, измеряли зону поражения МЛП кожи, рассчитывали площадь язвенной поверхности. На 112 день эксперимента от животных получали биоптат с МЛП для проведения гистологического исследования. В качестве статистического метода использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты: на 112 день эксперимента регистрировали наименьшую площадь МЛП в группе А+ЛП — $0,08 \pm 0,08$ см². В группах А, ЛП и К площадь МЛП составила $0,12 \pm 0,08$, $0,58 \pm 0,23$ и $2,15 \pm 0,57$ см², соответственно. Статистически значимые различия отмечали в группе К по сравнению с другими группами ($p \leq 0,05$).

Полное заживление МЛП отмечали у 80% животных в группе А+ЛП, в группах А, ЛП и К у 67%, 25% и 0% животных.

Таким образом, по клинической картине заживления была выявлена лидирующая группа — А+ЛП. При патогистологической оценке в группе А+ЛП отмечали дефект кожи с грануляционной тканью и участками фиброза, либо заживший дефект с толщиной эпителиального пласта 5–10 клеток. Дерма фиброзирована с единичными волосными фолликулами. Подкожная мышца

и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения без воспалений.

Заключение: Предложенная комбинированная терапия в группе А+ЛПГ показала свою эффективность при заживлении МЛПГ тяжелой степени. Изолированное использование АМ также показало свою эффективность — применение способствовало заживлению тканей и сокращению площади язвенной поверхности.

Литература:

1. Agraval U, Rundle P, Rennie IG et al. Eye (Lond). 2017 Jun;31(6):884–889.
2. Meller D, Pauklin M, Thomasen H et al. Dtsch Arztebl Int. 2011 Apr;108(14):243–8.

ВЛИЯНИЕ СТЕРИЛИЗАЦИИ В СРЕДЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ДИОКСИДА УГЛЕРОДА НА КАЧЕСТВО КОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫХ СУХОЖИЛИЙ

**А.А. Будаев¹, Н.В. Боровкова¹, А.Ю. Николаев²,
М.С. Макаров¹, М.В. Сторожева¹, Т.В. Черненькая¹**

¹ ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
ДЗ г. Москвы, Москва, Россия

² Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

e-mail: BudaevAA@sklif.mos.ru

Ключевые слова: сверхкритический, диоксид углерода, трансплантат, сухожилия, аллогенный, стерилизация.

Цель исследования — оценить стерильность, токсичность и целостность ткани трансплантатов аллогенных сухожилий при использовании разных режимов обработки в среде сверхкритического диоксида углерода (СК СО₂).

В работе исследовали 42 образца сухожилий *m. tibialis anterior* длиной 5 см, полученных от тканевых доноров. Образцы трансплантатов обрабатывали 10% диметилсульфоксидом 30 минут, помещали в криобрирки объемом 5 мл с перфорированной винтовой крышкой и упаковывали в комбинированный плоский пакет для газовой стерилизации с индикатором. В зависимости от режима стерилизации, образцы разделили на несколько групп: 1 и 4 группы — 6 часов, 100 атм., 2 и 5 группы — 10 часов, 100 атм., 3 и 6 группы — 72 часа, 75 атм. В группах 1–3 проводился медленный сброс давления СО₂ (декомпрессия), в 4–6 группах — быстрый. В качестве контроля использовали 6 образцов нативных сухожилий. После стерилизации трансплантаты 1–6 групп хранили при температуре –80оС в течение 14 суток, затем размораживали при +4оС. Стерильность сухожилий оценивали по стандартной методике с использованием тиогликолевой среды и бульона Сабуро. Гистологические препараты сухожилий окрашивали гематоксилин-эозином, также оценивали интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон. Исследование токсичности проводили в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека.

После вскрытия реакторов для стерилизации в среде СК СО₂ у групп образцов с режимом быстрой декомпрессии выявлены разрывы и намокание упаковочного пакета, у большинства криобрирок сорваны крышки, сухожилия находились на бумажной подложке пакета. В группах с медленной декомпрессией целостность пакетов, брирок и ткани визуалью была не нарушена.

На всех образцах сработал индикатор газовой стерилизации. При бактериологическом посеве трансплантаты из групп с медленной декомпрессией были стерильными, с быстрой декомпрессией — нестерильными. Коллагеновые волокна сухожилий 1–3 групп сохраняли свою целостность и топографию, были параллельно ориентированы и содержали незначительные локальные разрывы, интенсивность их автофлуоресценции соответствовала норме. В сухожилиях 4–6 групп отмечали выраженную отечность, наличие декондесированных волокон с распадом на отдельные фибриллы, обширные разрывы, интенсивность автофлуоресценции коллагена была снижена в 2,1–3,5 раза. Исследование *in vitro* показало, что все исследуемые типы трансплантатов не оказывали токсического действия на клетки.

Таким образом, режимы стерилизации сухожилий в среде СК СО₂ с медленной декомпрессией обеспечивают стерильность трансплантатов и позволяют эффективно сохранить архитектуру ткани.

ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

**А.А. Будюкова, С.В. Курбангалеева,
М.О. Гомзикова**

Казанский (Приволжский) Федеральный
Университет, Казань, Россия

e-mail: budyukova.O2@gmail.com

Ключевые слова: естественные везикулы, индуцированные микровезикулы, мезенхимные стволовые клетки, цитохалазин В.

Клеточная терапия на основе мезенхимных стволовых клеток (МСК) сопряжена с определенными рисками. Однако, везикулы, высвобождаемые МСК, сохраняют терапевтический потенциал родительских клеток. При этом они не несут риска онкотрансформации и являются безопасным терапевтическим инструментом. Главное препятствие для внедрения везикул в клиническую практику — это их ограниченный выход. Метод, разработанный Pick et al., позволяет получить индуцированные микровезикулы (МВ) с помощью цитохалазина В (ЦВ) в большом количестве за счет блокировки полимеризации актиновых филаментов цитоскелета [1]. Было показано, что естественные везикулы, полученные из МСК, демонстрируют иммуносупрессивную активность на дендритных клетках, Т и В-лимфоцитах, макрофагах [2]. Однако, обладают ли подобной способностью индуцированные МВ (далее МВ-ЦВ) оставалось до настоящего времени неизученным. Поэтому мы оценили иммуномодулирующую активность МВ-ЦВ, выделенных из МСК, на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) *in vitro*.

МКПК были изолированы из крови с использованием Фиколла путем центрифугирования в градиенте плотности. МВ-ЦВ были получены из МСК жировой ткани человека, обработанных 10 мкг/мл цитохалазина В. МКПК были окрашены CFDA SE, затем инкубированы с 10 мкг/мл МВ-ЦВ в течение 24 ч и проанализированы с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III.

Фитогемагглютинин (ФГА) способен индуцировать активацию и пролиферацию лимфоцитов *in vitro*. ФГА (10 мкг/мл) использовался в качестве контроля как активатор, так как было показано, что он повышает экспрессию CD25, являющегося маркером ранней активации лейкоцитов. Иммуноокрашивание с использованием

моноклональных антител CD4, CD19 и CD8 проводили на 3-й день после активации лимфоцитов. ФГА увеличил экспрессию маркера активации CD25 на Т-хелперах (CD4+CD25+; $86,6 \pm 5,1\%$), В-клетках (CD19+CD25+; $90,7 \pm 3,41\%$), и Т-цитотоксических лимфоцитах (CD8+CD25+; $87,36 \pm 3,35\%$). Предобработка МКПК микровезикулами с последующей активацией ФГА ингибировала экспрессию CD25 среди всех рассматриваемых субпопуляций лимфоцитов: на Т-хелперах ($37,56 \pm 9,14\%$), В-клетках ($44,93 \pm 8,05\%$) и Т-цитотоксических лимфоцитах ($19,96 \pm 2,44\%$).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что МВ-ЦВ МСК проявляют иммуносупрессивную активность на мононуклеарных клетках периферической крови человека. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 21-75-10035, в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Литература:

1. Pick H., Schmid E.L., Tairi A.P., et al. J.Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 2908–2912.
2. Di Trapani M., Bassi G., Midolo M., et al. Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 24120.

ДИОПСИД КАК НОСИТЕЛЬ РЕКОМБИНАНТНОГО BMP-2 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

И.Н. Булыгина^{1,2}, Ф.С. Сенатов^{1,2}, П.А. Орлова¹, А.В. Жулина¹, М.С. Попонина¹, Т.М. Грунина^{1,3}, К.Е. Никитин¹, Н.В. Струкова¹, М.С. Генералова¹, А.В. Рязанова¹, Р. Чоудхари^{4,5}, А.В. Громов¹, А.С. Карягина^{1,3,6}

¹ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

³ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии Москва, Россия

⁴ Рижский технический университет, Рига, Латвия

⁵ Балтийский центр передового опыта в области биоматериалов, Штаб-квартира в Рижском техническом университете, Рига, Латвия

⁶ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: ibulygina@misis.ru

Ключевые слова: силикатная керамика, диопсид, BMP-2.

Создание новых биоматериалов для регенеративной медицины направлено на улучшение свойств существующих материалов и конструкций с целью достижения ускоренной или же более качественной регенерации дефекта. Сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) уже зарекомендовал себя в качестве эффективного материала для реконструкции хряща, обеспечивая поверхность с низким коэффициентом трения. Однако исследования последних лет позволяют использовать пористый СВМПЭ и композиционный материал на основе СВМПЭ с добавлением гидроксиапатита также при регенерации костной ткани [1]. Одним из перспективных направлений в биомедицине является изучение свойств материалов

с альтернативными наполнителями, которые, благодаря своим уникальным характеристикам, могут обеспечить создание новых композиционных материалов с улучшенными свойствами. В качестве возможного наполнителя может рассматриваться диопсид (CaMgSi₂O₆), демонстрирующий осаждение апатита на поверхности при инкубации в растворе, имитирующем внеклеточную жидкость организма, что делает его многообещающим кандидатом для реконструкции костных дефектов [2]. Помимо этого, диопсид обладает хорошими сорбционными свойствами по отношению к костному морфогенетическому белку-2 (BMP-2), использование которого сопряжено с повышением регенеративного потенциала. В настоящей работе на первом этапе был получен диопсид с помощью ранее опробованного золь-гель метода с окислительно-восстановительными реакциями с использованием дополнительной стадии механоактивации [3]. Полученная фракция представляла собой мезопористые микрочастицы диопсида. Далее были получены композиционные материалы на основе СВМПЭ и диопсида. Для этого проводилась механоактивация порошков диопсида и СВМПЭ и их смешение с солью в планетарной шаровой мельнице, с последующим термопрессованием и обессоливанием. Полученные пористые композиционные материалы были охарактеризованы посредством сканирующей электронной микроскопии. На последнем этапе была продемонстрирована возможность использования разработанного имплантируемого материала на основе СВМПЭ, диопсида и BMP-2 для регенерации костной ткани на моделях in vivo. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-15-00216.

Литература:

1. Senatov F., Amanbek G., Orlova P. et al. MS&E:C. 2020. V. 111. P. 110750.
2. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. MS&E:C. 2021. V. 118. P. 111456.
3. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. JofACS. 2020. V. 8(3). P. 862–87

НОВЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГЛИОБЛАСТОМой

О.Ю. Буренина¹, Ю.П. Рубцов², М.С. Павлюков², О.Е. Мусатова², Т.С. Зацепин³, М.П. Рубцова³, О.А. Донцова^{1,3}

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академикова М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: alunit@inbox.ru

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, альтернативный сплайсинг, онкомаркеры, глиобластома.

Некодирующие РНК (нкРНК) — это, как правило, регуляторные молекулы, не подвергающиеся трансляции. Уровень их экспрессии зачастую чувствителен к малейшим изменениям в метаболизме клетки, в том числе обусловленных канцерогенезом. Ассоциированные с тем или иным видом рака днРНК могут быть использованы как специфичные онкомаркеры, а также как мишени для направленной терапии.

Ранее мы охарактеризовали новую печень-специфичную нкРНК HELIS [1], ген которой окружен неизвестными

днРНК, высокоспецифичными для тканей мозга. Мы провели биоинформатический анализ данного локуса и выбрали наиболее перспективные днРНК, активация экспрессии которых наблюдается при глиобластоме, что позволяет рассматривать их как потенциальные онкомаркеры. Нам удалось идентифицировать две новые днРНК LINC1102 и CABR1 в первичных культурах глиом человека [3], максимально приближенных по свойствам к раковым опухолям мозга и сохраняющих низкую степень дифференциации. При этом в обычных иммортализованных клеточных линиях экспрессия этих днРНК была на несколько порядков ниже.

Известной особенностью многих днРНК является альтернативный сплайсинг, приводящий к одновременному существованию в клетке нескольких изоформ. В базах данных аннотированы 4 транскрипта для CABR1 и 35 — для LINC1102. С помощью ОТ-кПЦР с парами праймеров, комплементарными различным экзонам или местам их соединений мы провели масштабный скрининг возможных транскриптов обеих днРНК, в результате которого оказалось, что ни одна из заявленных изоформ не является полностью верной. Для более точной характеристики CABR1 и LINC1102 мы провели идентификацию их 5'- и 3'- концов методом RACE с последующим секвенированием полученных фрагментов. В результате проделанной работы мы установили преобладающие и минорные изоформы каждой из двух днРНК и определили точные координаты их экзонов, что позволило подобрать наиболее перспективные мишени для направленного нокдауна. Мы также проверили, как направленное снижение экспрессии CABR1 и/или LINC1102 влияет на экспрессию маркеров ЕМТ и стволовых клеток (CD44, CD133, N- и E-кадгерин). Работа поддержана грантом РФФИ № 21-34-70042 мол_a_мос.

Литература:

1. Burenina O.Y., Lazarevich N.L. et al. J Cancer Res Clin Oncol. 2021. V. 147. P. 49.
2. Kovalenko T.F., Yadav B. et al. Biochimie. 2022. V. 200. P. 131.

БИМЕДИЦИНСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ СЕГНЕТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ ВИНИЛИДЕНФТОРИДА В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Е.Л. Бурьянская^{1,2}, О.В. Градов¹, М.А. Градова¹, Д.А. Киселев², В.В. Кочервинский³

¹ ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия

² НИТУ МИСиС, Москва, Россия

³ АО «ВНИИХТ», Москва, Россия

e-mail: m1707925@edu.misis.ru

Ключевые слова: биосовместимость, сегнетоэлектрические полимеры, адаптивные биоматериалы

Сегнетоэлектрические полимеры на основе винилиденфторида (ВДФ) являются гибкоцепными кристаллизуемыми материалами, относятся к классу электроактивных полимеров и обладают высокими значениями пьезо- и пиротоклика. Эти свойства, а также высокая химическая и термическая стабильность и близость значения акустического импеданса к значению такового в биологических тканях обуславливают перспективность использования сегнетоэлектрических полимеров в качестве биомедицинских материалов.

Устройства на основе таких материалов широко используются для регистрации физиологических

сигналов человека: снятия электрокардиограммы, контроля дыхания, измерения температуры тела и пульсовых волн. Сополимеры в виде пленок, волокон, пористых мембран и трехмерных пористых каркасов представляют большой интерес в приложениях тканевой инженерии для регенерации костной, мышечной и нервной ткани. Электроактивные макропористые пленки различной толщины, изготовленные методом спин-коатинга, также могут быть использованы в качестве материалов для создания интеллектуальных каркасов тканевой инженерии [1]. На основе сополимера ВДФ-ТрФЭ изготавливаются композитные покрытия имплантатов, которые, благодаря высоким остеоиндуктивным свойствам и способности сорбировать стволовые клетки, стимулируют репаративный остеогенез [2].

Биосовместимость полимерных медицинских материалов обеспечивается их химическими и физическими свойствами. В ходе работы были изучены структурно-морфологические, спектральные и электрофизические свойства пленок сополимера винилиденфторида с гексафторпропиленом. Фазовый состав материала исследовался с помощью ИК-Фурье спектроскопии. Морфология поверхности пленок была изучена методами атомно-силовой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Получены топографии поверхности пленок, рассчитаны значения среднеквадратичной шероховатости, проведены динамические наблюдения в электронном пучке. Методами силовой микроскопии пьезоотклика изучены пьезоэлектрические свойства материала.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № FFZE-2022-0009.

Литература:

1. Ferreira A., Silva J., Sencadas V. et al. Macromol. Mater. Eng. 2010. V. 295. P. 523.
2. Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A. et al. Mater. Sci. Eng. 2017. V. 75 P. 207.

ПОВЫШЕНИЕ ГИДРОФИЛЬНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА

Н.В. Бычков, А.А. Захаревич, Т.Е. Григорьев

¹ НИЦ Курчатowski институт, Москва, Россия

e-mail: nikita3262@yandex.ru

Ключевые слова: поверхностная модификация, полилактид, аминолиз, полимерные матриксы.

Полимерные материалы на основе полилактида привлекают внимание исследователей в различных сферах научной деятельности, в том числе и в регенеративной медицине. Полилактид обладает значительной прочностью, хорошей совместимостью с живыми тканями и не образует токсичных продуктов при деградации в физиологических средах человека. На основе полилактида различными методами получают скаффолды, хирургические соединительные элементы, части кровеносной и опорно-двигательной систем [1].

Несмотря на то, что внедрение в человеческий организм материалов на основе полилактида не вызывает опасных осложнений, существует ряд специфических проблем. Сам полилактид как материал обладает гидрофобными свойствами [2], что усложняет процесс клеточной пролиферации [3], замедляя тем самым восстановление поврежденных и замещаемых тканей после имплантации.

Поверхностная модификация полилактида реакцией аминолитиза позволяет сделать поверхность обрабатываемого материала более гидрофильной. Обработка полимерных пленок из полилактида 5% раствором 1,2-диаминоэтана в этиловом спирте при комнатной температуре на протяжении 1 часа приводит к увеличению краевого угла смачивания со 63,4 градусов до 87,7 градусов, что практически приближает поверхностные свойства материала к гидрофильным. Поверхность материала, подвергнутая аминолитизу, благодаря присоединению полифункционального амина приобретает функциональную группу, по которой можно проводить дополнительную модификацию полимера при необходимости.

Работа выполнена при поддержке госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. DeStefano, Vincent; Khan, Salaar; Tabada, Alonzo (2020). Engineered Regeneration, 1(2020), 76–87.
2. Gwang-Hoe Koo; Jinho Jang (2008). Surface modification of poly(lactic acid) by UV/Ozone irradiation. , 9(6), 674–678.
3. Ferrari, & Cirisano, Francesca & Morán, Maria. (2019). Colloids and Interfaces. 3. 48.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ СОСУДОВ ГОЛОВЫ И ШЕИ

И.Ю. Бычкова¹, Х.А. Абдувосидов², В.В. Рогинский¹

¹ ФГБУ НМИЦ Центральный НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: mana93@list.ru

Ключевые слова: эмбриональное развитие, магистральные сосуды головы и шеи, морфометрия, гиперплазия кровеносных сосудов, детские гемангиомы.

Актуальность. Для выявления периодов, в которые возможно возникновение гиперплазии кровеносных сосудов (ГКС), т.н. детских гемангиом в течение внутриутробной жизни (ВЖ), необходимо знание эмбриогенеза сосудов головы и шеи. На 3–4 неделях ВЖ дорсальная дуга 2 аорты становится подъязычной артерией и степиальной артерией [1, 4]. Вентральные аорты дают начало общей сонной артерии (ОСА) [4]. Наружная сонная артерия (НСА) развивается из корней вентральных аорт [1, 4]. Из 1 жаберной артерии образуются верхнечелюстная артерия, из 2-й — лицевая артерия [4]. Внутренняя сонная артерия (ВСА) происходит от третьей дуги и дорсальных корней аорты [1, 4]. На 6 неделе ЭР в передней части тела появляются крупные сосуды, они сходятся по обеим сторонам головы и образуют головные вены. Кровь по ним проходит через передние кардинальные вены, в протоки Кювье. В том месте, где передняя кардинальная вена впадает в проток Кювье, формируется ветвь, отводящая кровь от мандибулярной области — наружная яремная вена (НЯВ). Внутренняя яремная вена (ВЯВ) — передняя кардинальная вена — образуется на 32–40 день ВЖ [1].

Цель. Выявить динамику внутриутробного формирования и развития магистральных сосудов головы и шеи.

Материалы и методы. Исследован абортный материал, 25 эмбрионов и плодов человека от 3-х до 12-ти недель. Изготовлено 110 гистологических препаратов.

Окрашивание проводилось гематоксилин-эозином и импрегнацией серебром. Оценивалась скорость развития магистральных сосудов головы и шеи: ОСА, НСА, ВСА, ВЯВ: изучены толщина внутренней (tunica intima — Т. I.), средней (tunica media — Т. М.) и наружной (tunica adventitia — Т. А.) оболочек сосудистой стенки.

Результаты. На каждом этапе развития отмечается увеличение толщины каждой из оболочек изученных сосудов. С 3–4 недели внутриутробного развития начинается закладка и развитие лицевой артерии, и к 10-й неделе развития в толще языка формируется язычная артерия.

Заключение. Исследование внутриутробного развития сосудов необходимо продолжить, с учетом влияния внешних негативных факторов на развитие структуры стенки сосудов на каждом этапе гестации.

Литература:

1. Бычкова И.Ю., Рогинский В.В., Абдувосидов Х.А. и др. Медицинская наука и образование Урала. 2022. № 1. С. 51–54.
2. Бычкова И.Ю., Абдувосидов Х.А., Рогинский В.В. Acta Biomedica Scientifica. 2022. Т.7 № 1. С. 37–47.
3. Атлас патологии сосудов головы и шеи. Т.1 Под редакцией В.В. Рогинского. Москва. «Либерти плюс», 2022. С. 448.
4. Cheng-Chuan, Yen-Jun L., Wei-Jen L. American Journal of Case Report. 2018. № 19. P. 891–895.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗНАЧИМОСТИ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ ДЛЯ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЦА

Я.М. Валиева, А.В. Игункова, А.Л. Файзуллин, Н.М. Файзуллина, А.В. Курков

Институт регенеративной медицины, Сеченовский университет, Москва, Россия

e-mail: yana_valieva@mail.ru

Ключевые слова: бета-галактозидаза, клеточное старение, регенерация

Биомеханический стресс индуцирует старение клеток и их секреторную активность (SASP). Целью работы являлось изучить регенерацию эластического хряща в зависимости от размера механически нанесенного дефекта и активности клеточного старения.

Эксперимент проводился путём моделирования сквозных ран ушных раковин кроликов различных диаметров: 4мм (группа № 1), 6 мм (группа № 2), 8 мм (группа № 3) для оценки влияния размера дефекта на скорость и характер регенерации. На 30-е, 60-е, 90-е сутки животных выводили из эксперимента. Образцы забирали в пределах интактных тканей с отступом 0,5 см от края нанесенного дефекта. Полученный материал анализировали гистологическими, гистохимическими, морфометрическими и статистическими методами.

В результате наблюдалась нелинейная зависимость характера и скорости регенерации хрящевой пластинки от размера дефекта. На 30-е сутки в группе № 2 рост хряща был в 3,6 раза более равномерным, чем в группе № 1 (p<0,05). Окрашивание X-gal для выявления активной бета-галактозидазы стареющих клеток было более интенсивным в группе № 3, хрящ регенерировал с наибольшей скоростью: на 85% активнее, и на 80% равномернее чем в группе № 1 (p<0,05 и p<0,0001). Высокая скорость регенерации, скорее всего, ассоциирована с присутствием стареющих клеток, которые ускоряют регенерацию на ранних сроках. [1]. На 60 сутки во всех группах

уровень экспрессии бета-галактозидазы снижался. Это можно объяснить их элиминацией иммунными клетками. Замедление роста хряща, скорее всего, связано с ремоделированием внеклеточного матрикса [2]. На 90 сутки в группе № 2 выявили наименьшую активность бета-галактозидазы и наибольшую площадь регенератов. В группе № 3 уровень экспрессии бета-галактозидазы был в 5 раз выше, чем в группе № 2 ($p < 0,05$). Из этого следует, что длительная персистенция стареющих клеток негативно влияет на регенерацию [1].

Число стареющих клеток в ткани связано с размером дефекта. После повреждения стареющие клетки ускоряют регенерацию хряща, а при длительной персистенции ингибируют. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-75-00081.

Литература:

1. Ritschka B. et al. Genes & development. — 2017. — Т. 31. — № 2. — С. 172–183.
2. Yun M.H., Davaapil H., Brookes J.P. E-life. — 2015. — Т. 4.

Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

М. Ваньямбе¹, И.П. Иванова², Д.В. Дёмина², М.Н. Давыдова², Г.В. Селедцова², Е.А. Блинова²

¹ Институт медицины и психологии им.В. Зельмана при Новосибирском государственном университете, Новосибирск, Россия

² НИИ Фундаментальной и Клинической Иммунологии, Новосибирск, Россия

e-mail: wanyambemwiya433@gmail.com

Ключевые слова: Т-клетки, вакцинация, рассеянный склероз.

Четырнадцать пациентов с ремиттирующей формой рассеянного склероза были многократно иммунизированы аутологичной поликлональной Т-клеточной вакциной [1,2,3]. Индуцирующий курс иммунотерапии состоял из 4 еженедельных Т-клеточных вакцинаций. Вакцинальная доза варьировала в пределах $2,0-4,0 \times 10^7$ клеток. Поддерживающее лечение включало в себя вакцинации с интервалом в один месяц. Неврологический статус всех обследованных пациентов, оцениваемый по функциональной шкале Курцке с использованием расширенной шкалы инвалидизации (EDSS), до начала лечения составлял в среднем $3,6 \pm 0,39$ балла, среднее количество обострений в год — $1,4 \pm 0,16$.

В течение 1 года от начала лечения у всех наблюдавшихся больных обострений заболевания зарегистрировано не было, а у 11 из них отмечено отчетливо улучшение неврологических параметров (EDSS в среднем $2,9 \pm 0,38$). У 3 пациентов состояние сохранялось стабильным на протяжении всего срока наблюдения. Субъективная оценка основных симптомов заболевания показала, что у 9 из 14 пациентов уменьшилась слабость в конечностях, головокружение и шаткость при ходьбе; у 6 — улучшилась функция тазовых органов (произошло урежение императивных позывов); у 3 — уменьшилась утомляемость, проявления астении, эмоциональная лабильность. 3 пациента отметили улучшение когнитивной функции по MoCa тесту. Переносимость вакцинации в целом была удовлетворительной, единичные побочные эффекты в виде покраснения в месте инъекции купировались самостоятельно.

Проведение Т-клеточной вакцинации сопровождалось достоверным снижением уровня $IFN\gamma$ и подъемом уровня IL-4 и IL-10 в сыворотке крови пациентов, двукратным снижением частоты $IFN\gamma$ -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти. Также, у пациентов с рассеянным склерозом через 1 год после проведенного лечения регистрировалось значительное снижение пролиферативного ответа мононуклеарных клеток периферической крови на миелиновый антиген. Наши данные указывают на значительный иммунорегуляторный потенциал Т-клеточной вакцинации, которая в перспективе может найти широкое применение в лечении рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний.

Литература:

1. Иванова И.П., Селедцов В.И., Банул Н.В. и др. Мед. Иммунология. 2005. Т.7. № 1. С.27.
2. Hellings N., Raus J., Stinissen P. Autoimmun. Rev. 2004. V. 3. P. 267.
3. Willekens B., Cools N. CNS Drugs. 2018. V. 32. P. 401.

КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕАЦЕТИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАН-ГЛИЦЕРОФОСФАТНОГО ГИДРОГЕЛЯ С ВЫСОКОПОРИСТЫМИ PLA-ГРАНУЛАМИ И BMP-2 ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

А.В. Васильев^{1,2,4}, В.С. Кузнецова^{1,2}, Т.Б. Бухарова², Т.Е. Григорьев³, Ю.Д. Загоскин³, И.И. Бабиченко^{1,4}, С.Н. Чвалун³, Д.В. Гольдштейн^{2,4}, Ф.Ф. Лосев, А.А. Кулаков¹

¹ — ФГБУ Центральный НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии МЗ РФ, Москва, Россия

² — ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, Россия

³ — НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

⁴ — Российский Университет Дружбы Народов, медицинский институт, Москва, Россия

e-mail: vav-stom@yandex.ru

Ключевые слова: костно-пластический материал, BMP-2, хитозан, полилактид

Введение. Высокопористые полилактидные гранулы могут длительно высвободить малые дозы BMP-2, обеспечивая экто- и ортотопический неоостеогенез и исключая вероятные риски, которые могут быть связаны с избыточной концентрацией BMP-2: гиперостоз, воспаление, анаплазия (Vasilyev, et al., 2019, 2020). Использование полилактидных (PLA) гранул в сочетании с хитозан-глицерофосфатным гелем позволит улучшить его прочностные и манипуляционные свойства за счёт получения пластилиноподобной композиции, способной отверждаться после внесения в рану за счёт температуры внутренней среды организма и её буферных систем. Степень деацетилирования хитозана (DD%) при этом может оказывать выраженное влияние на цито- и биосовместимость, и на прочностные свойства системы. Однако взаимосвязь всех этих факторов ещё не была показана.

Материалы и методы. Образец хитозана (ChitoClear HGG 1600, «43040», Primex, Island) был реацетилирован до 19,5, 39, 49, 55, 56 DD% для исключения воздействия других факторов: длины цепи, степени очистки и пр. DD% устанавливали с помощью ¹H-NMR

и ИК-Фурье спектроскопии. Для получения гидрогелей стерильный хитозан растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли водный раствор β -глицерофосфата при температуре 4°C. Высокопористые (пористость 98%) частицы полилактида получали распылением замороженных эмульсий полимера с применением сублимационной сушки. Массовая доля полилактидных гранул составляла 1–20 %. BMP-2 импрегнировали в PLA-гранулы в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. Оценку цитотоксичности проводили на мультипотентных стромальных клетках (ММСК) человека с помощью МТТ-теста. Адгезию и выживаемость клеток на поверхности композиций материалов оценивали с помощью витального окрашивания PKH26, DAPI и кальцеином. Прочностные характеристики были исследованы на электромеханической системе «Instron-5965» (Instron, США). Биосовместимость и способность индуцировать экто- и ортотопический остеогенез исследовали на моделях подкожной имплантации и критического дефекта теменных костей у крыс линии Wistar. Для этого через 14 и 28 дней имплантированный материал подвергали гистологической обработке с последующей морфометрией.

Результаты и обсуждение. Снижение степени деацетилирования хитозана (DD%) в составе гидрогеля с β -глицерофосфатом приводило к увеличению относительной выживаемости клеток ММСК *in vitro* и снижению лейкоцитарной инфильтрации при подкожной имплантации крысам *in vivo*. Включение 12 масс.% полилактидных гранул оказалось оптимальным с точки зрения моделируемости композиции и приводило к возрастанию модуля упругости материала в ~100 раз, по сравнению с хитозановым гидрогелем без наполнителя. Избыточное наполнение PLA-гранулам более 15% приводило к разрушению материала при деформации ~10%. Остеоиндуктивные и остеокондуктивные способности материала на основе хитозанового гидрогеля из реацетилированного хитозана (39 DD%) и высокопористых PLA-гранул, импрегнированных BMP-2, были продемонстрированы на моделях орто- и эктопического остеогенеза. Так, при имплантации композиции внутрь критического дефекта теменных костей крыс оказалось, что концентрация BMP-2 10 мкг/мл обладала оптимальными свойствами: костная ткань в виде островков заполняла толщину всего материала. В тех же условиях при имплантации материала с 50 мкг/мл BMP-2 происходило избыточное разрастание костной ткани и выталкивание материала за пределы дефекта. Достаточные остеоиндуктивные свойства материала с 10 мкг/мл BMP-2 были также показаны при подкожной имплантации, то есть в условиях без костного окружения.

Заключение. Разработанная матрица костно-пластического материала на основе реацетилированного хитозана, β -глицерофосфата и высокопористых полилактидных гранул с BMP-2 может быть использована для получения способных к моделированию и биорезорбции биосовместимых остеопластических материалов, которые обладают выраженными остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами.

СФЕРОИДЫ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

И.В. Вахрушев¹, Г.Е. Леонов¹, А.В. Цветкова¹, В.Д. Новикова¹, Л.А. Кирсанова², П.А. Каралкин¹, С.А. Родионов³, Н.С. Сергеева³, Ю.Б. Басок², К.Н. Ярыгин¹

¹ ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова, Москва, Россия

³ МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: vakhrunya@gmail.com

Ключевые слова: клеточные сфероиды, мезенхимальные стромальные клетки, *in vitro* модели, хондрогенная дифференцировка, ангиогенез.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) широко применяют в тканевой инженерии благодаря их доступности, возможности дифференцировки в различных направлениях и иммуномодулирующим свойствам. Однако наиболее полным образом эти важные особенности ММСК проявляются лишь при наличии специфического окружения, формирующего их тканевую нишу *in vivo*. Одним из наиболее перспективных подходов к решению данной проблемы *in vitro* является трехмерное культивирование клеток в виде сфероидов. В отличие от двумерных культур, в сфероидах клетки имеют возможность образовывать контакты и обмениваться регуляторными сигналами, а также продуцировать экстрацеллюлярный матрикс, что способствует реализации их функций.

Данная работа посвящена применению сфероидов на основе ММСК из различных источников для моделирования регенеративных процессов *in vitro*.

В первой части работы был изучен хондрогенный потенциал ММСК при сфероидном культивировании [1]. Источниками ММСК были выбраны пульпа молочного зуба, Вартонов студень (строма) пуповины и подкожная жировая клетчатка, положительным контролем служили первичные хондроциты. Сфероиды получали путем агрегации 8 тыс. клеток в низкоадгезивных 96-луночных планшетах. Хондрогенную дифференцировку проводили в течение 3-х недель в среде, содержащей TGF- β 1. Гистохимический анализ всех образцов выявил прогрессивное накопление экстрацеллюлярного матрикса и присутствие в нем коллагена и гликозаминогликанов.

Далее была разработана 3D-модель ангиогенеза, основанная на культивировании сфероидов из ММСК и эндотелиоцитов в гидрогеле [2]. Сфероиды, состоящие из эндотелиоцитов пуповинной вены и МСК стромы пуповины в соотношении 1:1 (1000 клеток в одном сфероиде), культивировали в фибриновом геле с добавлением 20% лизата тромбоцитов (ЛТ). Прижизненное наблюдение осуществляли при помощи системы IncuCyte Zoom (Essen BioScience, США). Трехмерные отростки (спрауты), а также распределение обоих типов клеток в геле анализировали при помощи фазово-контрастной и сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Показано, что ЛТ поддерживал миграцию обоих типов клеток и способствовал образованию «истинных» в морфологическом плане спраутов, образующих анастомозы II типа.

Полученные результаты позволяют заключить, что модели, созданные на основе сфероидов из ММСК,

обладают высокой биологической релевантностью и могут быть широко использованы при разработке терапевтических регенеративных технологий. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Литература:

1. Цветкова А.В., Вахрушев И.В., Басок Ю.Б. и др. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2020. No 4. С. 237.
2. Vakhruшев I.V., Nezhurina E.K., Karalkin P.A. et al. *Biology (Basel)*. 2021. V. 11 P. 18. doi: 10.3390/biology11010018.

ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ И СНИЖЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА ТРАНСКРИПТОМ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА

Т.Ф. Вепхвадзе^{1,2}, М.А. Виговский^{1,2}, Н.С. Курочкина¹, П.А. Махновский¹, О.А. Григорьева², Е.М. Леднев¹, В.В. Филиппов², Я.Р. Бородай², М.Ю. Высоких^{1,2}, А.Ю. Ефименко², Д.В. Попов^{1,2}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: anegina13@gmail.com

Ключевые слова: старение, воспаление, двигательная активность, скелетная мышца, транскриптом, РНК секвенирование.

При старении наблюдаются комплексные изменения, включающие снижение двигательной активности, массы и функциональных возможностей (инсулиновая чувствительность, работоспособность и сила мышц) скелетных мышц, которые зачастую развиваются на фоне хронического воспаления. Цель работы — исследовать влияние старения на транскриптом скелетной мышцы человека.

Транскриптомный профиль (РНК секвенирование) скелетной мышцы пожилых пациентов с первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава (ОР, $n=35$, 72(66–83) года, индекс массы тела (ИМТ) 30(21–43) кг/м²) сопоставляли с транскриптомом молодых здоровых добровольцев (УН, $n=10$, 35(25–43) лет, ИМТ 22,5(18,9–29,4) кг/м²). Для выявления вклада хронического воспаления и снижения двигательной активности в изменение генной экспрессии УН сопоставляли с группой молодых пациентов с артрозом (УР, $n=7$, 39(26–45) лет, ИМТ 25,8(25,4–30,9) кг/м²). Для оценки влияния возраста сопоставляли группы УР и ОР.

Субъективная оценка двигательных возможностей не различалась между пациентами разного возраста и была значительно ниже, чем у УН. Маркеры воспалительного ответа (уровень лейкоцитов и нейтрофилов крови) были сопоставимы между ОР и УР, но значительно выше, чем в УН. У старых людей (сравнение ОР vs. УН) гены с повышенной экспрессией (2529) были ассоциированы с процессами воспаления, перестройкой внеклеточного матрикса и жировым обменом; гены с пониженной экспрессией (1007 генов), преимущественно, кодировали белки митохондрий и регуляторы углеводного обмена. У молодых пациентов (сравнение УР vs. УН) гены, увеличившие экспрессию (2107), были связаны с воспалением и биогенезом внеклеточного матрикса, а уменьшившие экспрессию (558) кодировали

митохондриальные белки. Эти изменения были сопоставимы, но менее выражены, чем при сравнении ОР vs. УН. Сравнение ОР vs. УР показало, что у пожилых пациентов количество изменивших экспрессию генов по сравнению с молодыми было значительно меньше, чем в остальных случаях: 536 и 299 снизили и увеличили экспрессию, соответственно.

Таким образом, у старых пациентов с первичным артрозом происходят выраженные изменения транскриптома скелетных мышц (ОР vs. УН). Большинство из этих изменений были обнаружены у молодых пациентов с артрозом и сниженной двигательной активностью относительно молодых здоровых людей (УР vs. УН). Это позволяет предполагать, что возраст-зависимые изменения транскриптома скелетных мышц индуцированы преимущественно воспалением и снижением двигательной активности.

Работа поддержана РФФ (грант 21-15-00405, биоматериалы здоровых добровольцев, транскриптомное исследование, биоинформатическое исследование), государственным заданием МГУ им. М.В. Ломоносова и выполнена с использованием оборудования, полученного в рамках программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова (биоматериалы пациентов, клинические и лабораторные исследования).

СЕНЕСЦЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ТЕРЯЮТ СПОСОБНОСТЬ ПОДАВЛЯТЬ РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ ПРИ СТАРЕНИИ

М.А. Виговский^{1,2}, Н.А. Басалова¹, У.Д. Дьячкова², В.С. Попов^{1,2}, А.Е. Толстолужинская², О.А. Григорьева¹, А.Ю. Ефименко^{1,2}

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

² Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: vigovskiy_m.a@mail.ru

Ключевые слова: фиброз легких, мезенхимные стромальные клетки, секретом, внеклеточные везикулы, индуцированная сенесценция, старение

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) признаны важнейшими регуляторами процессов репарации и регенерации поврежденных тканей. Во многих исследованиях была показана способность секретомы МСК, в том числе фракции внеклеточных везикул (ВВ), предотвращать вызванное повреждением развитие фиброза. Однако, в результате изменения микроокружения при повреждении состав секретомы МСК может существенно меняться. Ранее в нашей лаборатории было показано, что МСК, культивируемые в пролиферативных условиях, демонстрируют признаки индуцированного клеточного старения (сенесценции), при этом значительно снижается способность ВВ от таких клеток ингибировать дифференцировку миофибробластов в *in vitro* моделях. Целью данной работы было в сложной многофакторной модели фиброза легких *in vivo* проверить, утрачивают ли ВВ, секретируемые сенесцентными МСК (ВВсенМСК), свой антифибротический потенциал или локальное микроокружение способно скомпенсировать дисфункцию вводимых ВВ. Для этого у мышей разного возраста (4–6 нед и 20–24 нед) моделировали фиброз легких введением

блеомицина и через 14 дней интратрахеально вводили суспензию исследуемых ВВсенМСК, ВВконтрМСК в качестве положительного контроля или раствор DMEM в качестве отрицательного контроля. Мышам выполняли МРТ легких в динамике и на 28 день после введения блеомицина после эвтаназии забирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и легкие для гистологической оценки.

Нам удалось показать, что по результатам МРТ баланс регенерации в легких молодых мышей при лечении блеомицин-индуцированного фиброза смещается в сторону восстановления нормальной ткани при введении как ВВконтрМСК, так и ВВсенМСК на 14 день терапии (хотя для последних намечается тенденция к снижению эффективности).

У старых мышей терапия ВВконтрМСК способствует эффективному восстановлению функциональной ткани, в то время как ВВсенМСК оказываются не способны уменьшить площадь повреждения легких.

Помимо показанной нами ранее способности секретора МСК подавлять дифференцировку миофибробластов, важным механизмом его антифибротического действия *in vivo* может выступать модуляция местного иммунного ответа. Проанализировав состав (БАЛ) старых и молодых мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, мы обнаружили значительное повышение базального суммарного количества клеток основных гемопоэтических линий в БАЛ старых мышей и в этой же группе выявили тенденцию к снижению после введения ВВконтрМСК, но не ВВсенМСК.

Таким образом, индуцированная профиброзным микроокружением сенесценция МСК приводит к снижению антифибротического потенциала секретируемых этими клетками ВВ, что проявляет себя особенно ярко при наличии сопутствующих возраст-ассоциированных изменений в тканях, за счет механизмов, не ограничивающихся дифференцировкой миофибробластов в зоне повреждения. Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№ 19-29-04172).

RTCA-ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РАМКАХ ЭКСПЕРТИЗЫ КАЧЕСТВА

М.А. Водякова, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов

ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: vod-marina@mail.ru

Ключевые слова: клеточная линия, подлинность, экспертиза качества, биомедицинский клеточный продукт, высоко-технологический лекарственный препарат

В рамках экспертизы качества при государственной регистрации клеточных продуктов подтверждается подлинность клеточной линии. Пролиферативная активность клеточной линии является одной из характеристик ее подлинности. Перспективным методом определения пролиферативной активности является использование клеточного анализатора в режиме реального времени xCELLigence.

Цель исследования — получить и сравнить RTCA-профили (real time cell analyzer) клеточной линии МСК ЖТ_D122 на 10 и 12 пассажах.

Клеточная линия МСК ЖТ_D122 — МСК из ЖТ 42-летнего донора получена из «Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общепрофильного и биомедицинского направления)» (уникальная научная установка)

Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН. RTCA-профили получали с помощью клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent, США) по протоколу анализа клеточного индекса производителя в течение 120 ч.

Были показаны различные кинетические профили на 10 и 12 пассажах. Время удвоения клеток составило 41 ч для 10 пассажа и 54 ч — для 12. Максимальный клеточный индекс для 10 пассажа достигал 6, в то время как для 12 пассажа это значение было не выше 4,7. Скорость пролиферации на 10 пассаже была в 1,3 раза выше. Полученные результаты свидетельствуют о том, что RTCA-профилирование способно показывать не только разницу между различными клеточными линиями, но и разницу между пассажами одной клеточной линии, что характеризует метод как высокоточный и пассажеспецифичный и допускает возможность его применения при оценке качества продуктов на основе жизнеспособных клеток человека. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

НАРУШЕНИЯ ГОМЕОСТАЗА ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ СТАРЕНИИ СВЯЗАНЫ С РАЗВИТИЕМ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**Е.С. Войнова¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹,
К.Ю. Кулебякин¹, О.А. Григорьева²,
Е.С. Новоселецкая², Н.А. Басалова²,
Н.А. Александрович², М.С. Арбатский²,
М.А. Виговский², А.А. Зиновьева¹,
Е. Бахчинян¹, А.Ю. Ефименко²**

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

² *Институт регенеративной медицины, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

e-mail: voynovaes.pharm@gmail.com

Ключевые слова: старение, мезенхимные мультипотентные стромальные клетки, инсулинорезистентность, внеклеточные везикулы, секретом МСК.

В пожилом возрасте часто развивается ожирение и диабет 2 типа — заболевания, связанные с нарушениями обмена жировой ткани. За обновление жировой ткани ответственны мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), дифференцирующиеся под действием инсулина. Именно с нарушением чувствительности к данному гормону связывают метаболические нарушения, возникающие при старении.

Цель нашего исследования — выяснение механизмов нарушения чувствительности МСК к инсулину при старении.

Методы. В работе использовались МСК подкожной жировой клетчатки, полученные от молодых и пожилых доноров, а также репликативно состарившиеся МСК, проявляющие признаки сенесценции. Для стимуляции дифференцировки МСК использовали редуцированный адипогенный коктейль (инсулин, дексаметазон, IBMX). Четвертый компонент — индометацин — прямой активатор мастер-гена адипогенной дифференцировки PPAR γ не использовался, так как нашей задачей было изучение физиологических путей активации данного фактора.

Для оценки эффективности дифференцировки использовали цитофлуоресцентное окрашивание красителем NileRed. Методом ПЦР в реальном времени оценивалась экспрессия ключевых маркеров дифференцировки. Внеклеточные везикулы (ВВ) получали кондиционированием клеток в течение 2 суток. Для концентрирования ВВ использовали центрифужные ультрафильтры-концентраторы. Для оценки активности инсулин-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов использовался метод иммуноблоттинга.

Результаты. При старении происходило значительное снижение адипогенного потенциала МСК, связанное с развитием инсулинорезистентности. Это было обусловлено повышением базального уровня активации Erk1/2 и Akt — основных участников инсулиновой сигнализации. Далее мы выяснили, участвует ли секретом сенесцентных МСК в развитии их инсулинорезистентности. Проанализировав транскриптом секретом сенесцентных МСК в сравнении с молодыми, мы обнаружили, что сенесцентные МСК продуцировали ВВ с повышенным содержанием микроРНК, мишенями которых являются молекулы, участвующие в развитии и регуляции адипогенных сигналов в клетке и в сигнальном ответе на инсулин. Добавление ВВ от молодых МСК к сенесцентным клеткам восстанавливало адипогенный потенциал, а добавление ВВ от сенесцентных МСК к молодым клеткам — снижало. Добавление к молодым МСК ВВ от сенесцентных клеток приводило к повышению в них базального уровня активации Erk и Akt.

Таким образом, при старении происходит снижение адипогенного потенциала МСК, связанное индукцией инсулинорезистентности компонентами секретом сенесцентных клеток. Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-29-04172 мк.

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТА ХИТОЗАН-СЕРЕБРО С ДОБАВЛЕНИЕМ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА

Д.А. Волков¹, И.Е. Ребров², Т.Е. Григорьев¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ИЭЭ РАН, Москва, Россия

e-mail: da.volkov@physics.msu.ru

Ключевые слова: электроспиннинг, хитозан, серебро, полиэтиленоксид, электропроводящие материалы.

В последнее время технология электроспиннинга стала универсальным методом получения нетканых материалов с довольно обширной возможностью использовать их в разных областях, включая медицину. В частности, ряд различных нановолокон на основе хитозана привлекает большое внимание благодаря возможности их применения в таких направлениях, как тканевая инженерия [1], доставка лекарств [2] и т.д. Одним из перспективных наполнителей хитозановых волокон являются наночастицы серебра, обладающие рядом отличительных антибактериальных, оптических и электропроводящих свойств.

В данной работе наночастицы серебра сферической формы были получены в хитозановом растворе в уксусной кислоте, где хитозан выступал в роли восстановителя. С применением метода электроформования, описанном в работе [3] (рабочее напряжение составляло $U=18\text{кВ}$), были получены материалы на основе хитозан-серебро с добавлением полиэтиленоксида, который

использовался для улучшения характеристик формуемого раствора для электроспиннинга.

Коллекторная система при формировании представляла собой 2 электрода напротив друг друга на расстоянии 4 см, что позволило получить образцы размером 2×4 см. Сопротивление полученных материалов по направлению укладки волокон составляло ~ 15 ГОм. Также было определено, что наночастицы серебра распределены по объёму волокна, размер волокон при этом неоднородный: от ~ 30 нм до ~ 1 мкм.

Вследствие высокой биологической активности хитозана и включению электропроводящих наночастиц серебра полученный материал перспективен для использования в качестве матрикса для ориентированного выращивания клеточных культур мышечных и нервной тканей. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Литература:

1. Shabnam M., Javad M., Behnaz B. et al. International Journal of Biological Macromolecules. 2019. V. 140. P. 278.
2. Jiankang S., Stefan J.A., Jinlong S. et al. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2016. V. 12 P. 1357.
3. Kashin A.V., Rebrov I.E., Khomich V.Yu. Applied physics. 2018. V. 3. P. 85.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО ОЖОГА

М.В. Волкова¹, В.В. Бояринцев¹, А.В. Трофименко¹, С.П. Рыбалкин², Е.В. Ковалева², Г.И. Фильков¹, М.О. Дурыманов¹

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

² Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, НИЦ ТБП — филиал, Серпухов, п. Большевик, Россия

e-mail: biotech.volkova@list.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, гипоксия, нормоксия, доклинические исследования, животная модель

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются одной из потенциальных стратегий лечения различного рода травм благодаря их способности стимулировать заживление и регулировать иммунный ответ. Культивирование клеток *ex vivo* в условиях пониженного содержания кислорода способствует усилению регенеративных свойств МСК [1–3]. Целью работы являлось экспериментальное изучение эффективности МСК, выращенных в условиях нормоксии и гипоксии, на экспериментальной модели химического ожога в условиях гипоксии и гипотермии.

Для проведения исследований использовались охарактеризованные МСК, выделенные из красного костного мозга мышей Balb/c. Одну клеточную популяцию культивировали в условиях нормоксии (21 % O_2), другую — в условиях физиологической гипоксии (5 % O_2). Химический ожог у животных получали с помощью 40 % раствора гидроксида калия. В течение двух суток (до и после нанесения травмы) животные находились в климатической камере в условиях гипотермии и гипоксии (4 °C, 15 % O_2). Через сутки после нанесения травмы

животным вводили суспензию МСК или физраствор по периметру раны.

Подкожная инъекция МСК-гипоксия способствовала ускорению деквамации струпа в 2,3 и 1,4 раза, а также способствовала уменьшению площади раны в 1,2 и 2,3 раза по сравнению с группами МСК-нормоксия и контроль соответственно. Таким образом, суспензия МСК, выращенных в гипоксии, является перспективным способом лечения ожогов, в том числе полученных в экстремальных для организма условиях гипотермии и гипоксии. Работа выполнена при поддержке гранта по соглашению от 28 ноября 2018 года № 14.575.21.0179 (идентификатор проекта RFMEFI57518XO179), заключенному между Минобрнауки РФ и МФТИ.

Литература:

1. Han Y. et al. *Cells*. 2019. V. 8 (8). P. 886.
2. Fan X.L. et al. *Cellular and molecular life sciences*. 2020. V. 77 (14). P. 2771–2794.
3. Samal J.R. K. et al. *Advanced Healthcare Materials*. 2021. V. 10 (6). P. 2002058.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИПСК ИЗ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ GNAO1 ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Е.А. Воловиков^{1,2}, Д.М. Спиринов^{1,2}, А.Н. Богомазова¹

¹ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

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

e-mail: volovikovea@gmail.com

Ключевые слова: ИПСК, GNAO1, нейроны, эпилепсия

Ген GNAO1 кодирует альфа-субъединицу гетеротримерного комплекса G-белков. Мутации в этом гене являются причиной ранней эпилептической энцефалопатии 17-го типа (РЭЭ17) [1]. Известно две белковых изоформы GNAO1 [2], но их функциональная значимость изучена недостаточно. Существующие животные модели РЭЭ17 не полностью воспроизводят молекулярную патологию заболевания [3]. Ввиду того, что РЭЭ17 является наследственным заболеванием с ранним появлением первых симптомов, особый интерес представляют молекулярные механизмы патогенеза на ранних стадиях развития организма. Таким образом, целью нашей работы стала разработка клеточной модели РЭЭ17-го типа и изучение функций GNAO1 в эмбриогенезе.

Нами были получены фибробласты кожи от пациента с диагностированной РЭЭ17, которые затем репрограммировали до плюрипотентного состояния неинтегративным методом. Полученные ИПСК были охарактеризованы и обладают нормальным кариотипом. Направленной дифференцировкой из ИПСК с мутацией в гене GNAO1 и из ИПСК здоровых доноров были получены культуры нейронов и органоиды мозга. Экспрессию обеих белок-кодирующих изоформ GNAO1 в ИПСК, нейрональных предшественниках и органоидах показали на уровне РНК. Методом ИЦХ было показано, что в ИПСК GNAO1 локализован преимущественно в ядре, в то время как в зрелых нейронах он локализован преимущественно в цитоплазме.

Полученные данные позволяют предположить, что роль GNAO1 в раннем эмбриональном развитии

отличается от таковой в зрелом мозге и могут послужить базой для дальнейших исследований.

Литература:

1. Feng H. et al. *Neurobiol Dis*. 2018. 116:131–141
2. Murtagh J.J. Jr et al. *Mol Cell Biol*. 1991. 11(2):1146–1155
3. Feng H. et al. *PLOS ONE*. 2019. 14(1):e0211066

РЕГУЛЯЦИЯ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫМ ПЕПТИДОМ-1

Н.С. Волошин¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет Фундаментальной Медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: VoloshinNS@my.msu.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые/стромальные клетки, адипогенная дифференцировка, адипогенез, ГПП-1, лираглутид, ДПП-4, алоглиптин.

В современном мире заболеваемость ожирением и сахарным диабетом неуклонно растет. В то же время фармакологическая индустрия предлагает все больше методов борьбы с этими заболеваниями, в частности, становятся популярнее препараты, относящиеся к сигнальной системе глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) — агонисты рецептора ГПП-1 и ингибиторы ДПП-4. Однако в современной литературе данные о влиянии глюкагоноподобного пептида-1 на адипогенез, нарушение которого является ключевым звеном патогенеза метаболического синдрома, противоречивы: в исследованиях на клетках мыши продемонстрировано положительное влияние ГПП-1 на адипогенез [1], в то время как на клетках человека показано обратное [2]. Но работы, проведенные на клетках человека, обладают рядом недостатков, например, нет работ, проведенных на клетках, полученных от здоровых доноров.

Целью нашей работы является исследование влияния ГПП-1, его комбинации с ингибитором ДПП-4 алоглиптином, а также агониста ГПП-1 лираглутида на адипогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) из подкожной жировой клетчатки живота, полученных от здоровых доноров.

Оценка адипогенной дифференцировки ММСК производилась при помощи флуоресцентной микроскопии с окраской Nile Red на 14-й день, ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на гены-маркеры адипогенной дифференцировки — PPAR γ и адипонектин. Также оценка динамики адипогенной дифференцировки производилась при помощи фазово-контрастной микроскопии клеток на протяжении нескольких дней с последующим автоматическим подсчетом клеток с жировыми каплями при помощи свёрточных нейронных сетей из модуля NIS.ai в ПО NIS Elements AR.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что ни лираглутид, ни комбинация ГПП-1 с ингибитором ДПП-4 алоглиптином не влияют на накопление клетками жировых капель, однако лираглутид значительно изменяет экспрессию адипонектина и PPAR γ , что наблюдается в гораздо меньшей степени для комбинации ГПП-1 и алоглиптина и совсем не наблюдается для только ГПП-1.

Следовательно, участники сигнальной системы ГПП-1 участвуют в регуляции адипогенной дифференцировки ММСК в первую очередь за счет изменения экспрессии генов-маркеров адипогенной дифференцировки, не влияя при этом значимо на накопление клетками жировых капель. С точки зрения метаболической выгоды лираглутид является более выгодным, чем ингибиторы ДПП-4, за счет более выраженного повышения экспрессии адипонектина в зрелых адипоцитах.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00311 «Механизмы межклеточной коммуникации в поддержании гомеостаза и регуляции обновления жировой ткани».

Литература:

1. Zhang F. et al. *Iscience*. Elsevier, 2021. Vol. 24, № 12. P. 103382.
2. Cantini G. et al. *Molecular and cellular endocrinology*. Elsevier, 2014. Vol. 402. P. 43–50.

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖИ: ОЧЕВИДНЫЕ МОДЕЛИ И НЕОЧЕВИДНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Е.А. Воротеляк, Е.И. Моргун, Э.С. Чермных, О.С. Роговая, Е.П. Калабушева

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

e-mail: vorotelyak@yandex.ru

Ключевые слова: кожа, острая рана, ишемизированная рана, регенерация, моделирование на животных

Для проведения исследований в области регенерации кожи возможно использование моделей как *in vitro*, так и *in vivo*. В коже млекопитающих преобладающими типами клеток являются фибробласты и кератиноциты. В подавляющем большинстве исследований по заживлению ран *in vitro* используют один или оба из этих типов клеток. Изучение клеточного поведения в двумерных условиях культуры дает возможность исследовать конкретные мишени с минимальным воздействием внешних факторов. Однако, подобные внешние факторы критичны в условиях *in vivo* (паракринная сигнализация, трехмерный сигнальный каскад и т.д.) и их отсутствие, как правило, ограничивает применение исследований *in vitro*. Сложный процесс заживления ран в естественных условиях не может быть полностью воспроизведен в культуральной чашке, и модели на животных являются необходимым инструментом в изучении патологий кожи и ранозаживления.

Для изучения заболеваний кожи используют различные виды животных, от грызунов до приматов. Однако по разным причинам грызуны остаются наиболее распространенным объектом. Существуют сотни мышиных моделей с заболеваниями человека, и во многих случаях ген интереса, вызывающий болезнь, мутирован и у человека и у мыши. Мыши и крысы также в подавляющем большинстве случаев используются для изучения ранозаживления. Описаны различные модели ран, в том числе ожоговая, резаная, полнослойная, ишемически — реперфузионное повреждение ткани (модель пролежневых язв, хронических ран), ишемизирование лоскута. Выбор типа нанесения раны зависит от целей исследования и предполагаемого ожидаемого терапевтического эффекта от исследуемого агента.

Однако кожа грызунов имеет ряд отличительных черт, которые могут существенно повлиять на интерпретацию результатов. Кроме того, методы анализа патологических процессов тоже не всегда релевантны.

На современном уровне знаний о патологии кожи и процессов регенерации необходимо весьма тщательно подходить к выбору модели и методов оценки результатов. Работа ведется за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30015).

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМАЯ МЕТКА ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО МОНИТОРИНГА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А.Н. Габашвили¹, Д.Д. Наместникова^{2,3}, И.Л. Губский^{2,3}, К.К. Сухинич⁴, Н.А. Александрович⁵, Н.С. Чмелюк^{1,2}, С.С. Водопьянов^{1,5}, А.С. Семкина^{2,6}, М.В. Ефремова^{7,8}, П.И. Макаревич⁵, М.А. Абакумов^{1,2}

¹ НИТУ МИСиС, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

⁴ ФГБНУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

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

⁶ ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия

⁷ Technische Universität München, München, Arcisstraße, Germany

⁸ Helmholtz Zentrum München GmbH, Neuherberg, Germany

e-mail: gabashvili.anna@gmail.com

Ключевые слова: инкапсулины, МРТ-визуализация, стволовые клетки, отслеживание клеток

В последнее десятилетие мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все чаще используются в качестве препаратов для терапии ряда заболеваний нервной системы, в силу своей уникальной способности к самообновлению и дифференцировке.

Выбор оптимального пути введения клеток и таргетность доставки могут иметь решающее значение в реализации терапевтической эффективности клеточного препарата. Необходим контроль клеток после введения, чтобы избежать побочных эффектов, таких как злокачественная трансформация или нежелательная пролиферация клеток. В силу чего, долгосрочный неинвазивный мониторинг клеток после введения является крайне актуальной задачей.

В настоящем исследовании представлена клеточная линия МСК человека, содержащая генетически кодируемую метку на основе инкапсулина бактерии *Quasibacillus thermotolerans* (*Q.thermotolerans*, *Qt*). Инкапсулин представляет собой белковую оболочку диаметром 42 нм, образующуюся путем самосборки из 240 белков-мономеров (32,2 kDa каждый), внутри которой находится грузовой белок — фермент IMEF (Iron-Mineralizing Encapsulin-Associated Firmicute, 42 димера, 22,6 kDa каждый), окисляющий двухвалентное железо до трехвалентного. Таким образом, образуется икосаэдр с поистине огромным весом 9,6 MDa, внутри которого может накапливаться около 30 000 атомов железа [1], что делает инкапсулин *Qt* прекрасным кандидатом для использования в качестве МРТ метки.

Гены, кодирующие метку, были встроены в геном МСК методом лентивирусной трансдукции, что позволило получить стабильную клеточную линию. Экспрессия элемента генетической метки была подтверждена методами ПЦР

и Вестерн блот, тогда как ПЭМ позволила визуализировать отдельные железосодержащие наночастицы в цитоплазме и нуклеоплазме клеток, со средним диаметром 32 ± 4 нм. Было показано, что в составе наночастиц присутствуют железо и кислород. Генетическая метка не оказывала влияния на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а наличие железосодержащих наночастиц в инкапсулированных визуализировать МСК в головном мозге крысы методом МРТ как после стереотаксического, так и после интраартериального введения. Было продемонстрировано, что интенсивность МР-сигнала оставалась на постоянном уровне в течение 7 дней после стереотаксического введения клеток в головной мозг животных.

Литература:

1. Giessen, T.W. Elife, 2019. V. 8. e46070.

ЦИТОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ СЕКРЕТОМА МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

М.А. Габриелян, П.А. Ахметова, В.Д. Муренце¹

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

e-mail: gabrielyanmara16@gmail.com

Ключевые слова: цитопротективный эффект, МСК, секретом, фибробласты.

Недавние исследования показали, что скорее молекулы, продуцируемые МСК (секретом), особенно содержащиеся во внеклеточных везикулах, а не сами клетки, отвечают за регенерацию тканей [1, 2].

Первичные культуры МСК жировой ткани крысы, полученные путем ферментативной диссоциации коллагеназой, культивировались в среде DMEM с 5% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе ИЛМ-170-01 (ЛамСис, Россия). Для получения секретом МСК, клетки на 3-ем пассаже помещались в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч при комнатной температуре, после чего надосадочную жидкость фильтровали и центрифугировали при помощи многофункциональной центрифуги Thermo Scientific SL 16R (Thermo, Германия).

Клетки культуры фибробластов легкого взрослой крысы (Sigma-Aldrich, США) рассеивались в 24-луночные планшеты и культивировались в течение суток в стандартных условиях с добавлением полученного секретом (опыт) и без (контроль). Клетки обеих групп подвергались 2-часовому оксидативному стрессу, индуцированному воздействием раствора перекиси водорода (60 мкМ) [3].

Определение количества живых и погибших клеток проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями кальцеином AM (Sigma-Aldrich, США) и йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, США). Клетки открывали от культурального пластика с помощью коктейля Accutase (Sigma-Aldrich, США). Клетки окрашивали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) с 1% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей 1 мкг/мл кальцеина AM и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 минут при 37°C. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра Novocyt 3000 (ACEA Biosciences, США).

Клетки опытной группы показали статистически достоверно более высокую в сравнении с контролем жизнеспособность (на 24,05%). Полученные данные

свидетельствуют в пользу наличия цитопротективного эффекта секретом МСК.

Литература:

1. Mitchell R., Mellows B., Sheard J. et al. Stem Cell Res Ther. 2019 V. Apr 5. № 10(1). P. 116.
2. Haque N., Widera D., Govindasamy V. et al. Curr Mol Med. 2022. № 22(2). P. 120.
3. Сазонова Е.Н., Яковенко Д.В., Лебедько О.А. и др. Дальневосточный медицинский журнал. 2015. № 4. С. 80.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ ПРОГЕНИТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА

А.О. Гайдамака, Л.Ш. Измайлова, Е.А. Воротеяк

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

e-mail: stadtrand@yandex.ru

Ключевые слова: Эндометрий, гетерогенность стромальной популяции, мезенхимная стволовая клетка (МСК)

Эндометрий является внутренней оболочкой матки. В ходе менструального цикла он проходит фазы пролиферации, дегенерации и регенерации. Эти процессы связаны с активностью стволовой популяции эндометрия. Существует несколько маркеров стволовой популяции эндометрия, которые были обнаружены в строме эндометрия человека. Предполагается, что они маркируют популяцию МСК. Локализация некоторых маркеров, например, CD90, ограничивается функциональным слоем и периваскулярной областью в базальном слое. CD146, в свою очередь, маркирует пернициты. Известно, что процентное соотношение клеток, экспрессирующих эти маркеры меняется в течение менструального цикла. Эндометрий мыши также подвергается изменениям в ходе эстрального цикла, однако они не так выражены, как у человека. О прогениторной популяции клеток эндометрия мыши и ее локализации имеются лишь фрагментарные данные.

На первом этапе работы криосрезы матки взрослой мыши на разных стадиях эстрального цикла окрашивали антителами к широкой панели маркеров. Иммуногистохимическое окрашивание выявило гетерогенность в строме эндометрия мыши на всех стадиях онтогенеза (E18,5, P5 и взрослая мышь) по маркеру CD146. Гетерогенность по распределению иммунофлуоресцентного окрашивания CD90 была обнаружена только в эндометрии взрослой мыши и у эмбриона на стадии E18.5.

Строма, положительно окрашенная на CD146, представлена или отдельными клетками или образует тяжи в стромальном компартменте, а также определяется вокруг стенок сосудов и маточных желез. Окраска на CD146 локализована на срезах эндометрия с положительной окраской на CD90. К CD90+ области относится строма, подлежащая люминальному эпителию и маточным железам.

В тотальной фракции клеток эпителия и стромы, выделенных из эндометрия мыши на разных стадиях цикла была проанализирована экспрессия маркеров CD90 и CD146 при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Были выделены следующие субпопуляции: эпителиальные клетки EPCAM+/CD90low- и 2 популяции стромальных клеток EPCAM-/CD90- и EPCAM-/CD90+. В фазе эструса и эструса, индуцированного E2, наблюдалась наибольшая медиана интенсивности флуоресценции (MFI) CD90+ популяции.

Полученные данные важны для определения различий в свойствах и локализации стволовой популяции у мыши и у человека. Понимание этих различий необходимо для изучения эндометрия человека с использованием мыши в качестве модельного объекта. Работа выполнена за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-74-30015).

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОГЛИИ В ПОЯСНИЧНОМ УТОЛЩЕНИИ СПИННОГО МОЗГА ПОСЛЕ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ В НИЖНЕГРУДНОМ ОТДЕЛЕ У МИНИ-СВИНЕЙ

Р.Р. Гарифулин, М.А. Давлеева, Э.И. Бариев, С.С. Таргачев, Р.Х. Ахметов, И.С. Минязева, В.П. Петрова, А.Р. Хамитов, А.А. Измайлов, Р.Р. Исламов

ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

e-mail: ravil.116rus@mail.ru

Ключевые слова: контузионная травма спинного мозга, нейроглия, мини-свинья, поясничное утолщение.

Многочисленные научные работы, посвященные изучению травмы спинного мозга (ТСМ), нацелены на исследование реактивной нервной ткани, непосредственно прилегающей к очагу поражения спинного мозга. При этом, патологические сдвиги градиентно распространяются в роstralном и каудальном направлениях от эпикентра нейротравмы. Феномен отдаленных вторичных повреждений имеет важное значение в посттравматическом восстановлении спинного мозга и является актуальным направлением для разработки принципов нейрореабилитации пациентов с ТСМ.

Цель исследования — иммунофлуоресцентный анализ клеток нейроглии в поясничном утолщении спинного мозга через 60 сут после моделирования контузионной травмы на уровне Th8-Th9 у мини-свиной.

В исследовании были использованы самки мини-свиной (вьетнамская вислобрюхая) весом 20–25 кг (n=8): интактные животные (n=4) и опытные животные с контузионной ТСМ (n=4). Дозированную контузионную травму вызывали между позвонками Th8 и Th9 с помощью металлического стержня массой 50 г, падающего с высоты 50 см на открытый спинной мозг. Через 60 суток после моделирования нейротравмы поясничной отдел спинного мозга процессировали для иммунофлуоресцентного исследования.

Поперечные срезы спинного мозга толщиной 20 мкм окрашивали с помощью антител против маркеров астроцитов (GFAP), олигодендроцитов (Olig2) и микроглии (Iba1). Экспрессию GFAP и Iba1 оценивали как относительную иммунопозитивную площадь в процентах, количество Olig2-иммунопозитивных ядер подсчитывали с учетом окраски ядер с помощью DAPI. Результаты представлено как средняя ± стандартная ошибка среднего.

Анализ экспрессии GFAP показал увеличение относительной GFAP-позитивной площади в поясничном утолщении у опытных животных как в передних (26,99±0,97%), так и в задних (18,37±2,06, %) рогах, при сравнении с интактными животными (10,15±0,6% и 16,9±1,14%, соответственно). Относительная Iba1-позитивная площадь была также больше у опытных животных в передних (18,73±0,49%) и задних (15,38±0,63%) рогах, при сравнении с интактными животными (9,53±0,94% и 8,13±0,28%, соответственно). Количество

Olig2-положительных ядер у интактных мини-свиной составило 13±0,93 в передних и 11,33±1,23 в задних рогах. При этом у опытных мини-свиной было выявлено меньшее количество Olig2-положительных ядер как в передних (4,67±0,61), так и в задних (3,67±0,33) рогах.

Таким образом, увеличение площади, занимаемой астроцитами и клетками микроглии, а также снижение количества олигодендроглиальных клеток в поясничном утолщении спинного мозга через 60 сут после контузионной травмы в нижнегрудном отделе у мини-свиной свидетельствуют о вторичных патологических изменениях в нервной ткани, удаленной от эпикентра нейротравмы.

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА Е И ЭКСТРАКТА АМЛЫ НА ЦИБРИДЫ

А.Д. Гелетканич, Е.Б. Жигмитова^{2,3}, Е.Е. Безсонов^{2,3}

¹ РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

² ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

³ Институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

e-mail: artiom.geletkanich@yandex.ru

Ключевые слова: антиоксиданты, митохондрии, мутации, цибриды, гетероплазмия, атеросклероз.

В развитие атеросклероза вовлечено множество факторов и дисфункция митохондрий в клетках пораженной области, может занимать ключевую роль в возникновении и прогрессировании заболевания [1]. Митохондриальная дисфункция проявляется в виде мутаций мтДНК, вызывая окислительный стресс, ухудшенному развитию АТФ [2]. Явление, когда мутировавшая мтДНК может сосуществовать с не мутировавшей мтДНК, называется гетероплазмией. Антиоксиданты, например, витамин Е (VE) и *Emblica officinalis* (EO), теоретически могут снижать степень окислительного стресса [3,4]. Удобной моделью для изучения роли митохондриальных мутаций являются цибриды. Поскольку мутации мтДНК могут быть связаны со степенью активации моноцитов, были использованы цибриды, полученные из моноцитарной линии ТНР-1 с разной мтДНК пациентами с атеросклерозом.

ТНР-1, TCN-521, LSM1 культивировали 48 ч с VE и EO с концентрацией 15 и 500×10³ мг/л соответственно. Выживаемость была высокой с VE 96–98%, но с EO была относительно низкой 75–86%. После инкубации с антиоксидантами измеряли гетероплазмия мутаций, связанных с атеросклерозом: T3336C, C3256T, C5178A [1]. VE не повлиял на гетероплазмия ТНР-1, но у TCN-521 смог уменьшить на 4,4±1,82% у мутации C5178A. Клетки линии LSM1 мутации T3336C уменьшилась с 50±0,7% до 39±3,1%, а при мутации C3256T увеличилась на 6,4±1,5%. При культивировании с ЭА гетероплазмия у ТНР-1 на всех мутациях снизилась от 2,4±0,6% до 9,9±2%, у TCN-521 и LSM1 максимальное снижение отмечено у мутации T3336C на 8,3±2,4% и 8,2±2,5% соответственно. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 22-25-00480.

Литература:

1. Bezsonov E.E., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Int J Mol Sci 2021; 22(8): 4080
2. Mitrofanov K.Y. et al. Experimental and Molecular Pathology. — 2016. — Т. 100. — №. 1. — С. 87–91.

3. Nashine S. et al. Aging (Albany NY). — 2019. — Т. 11. — №. 4. — С. 1177.
4. De Gaetano, G. (2001). Lancet (London, England), 357(9250), 89–95.

БИОТРАНСПЛАНТАТ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ГУБЫ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

М.Ю. Герасимов, Д.С. Островский, Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенков

Лаборатория трансплантологии и клеточной биологии ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: gerasimovmy@mntk.ru

Ключевые слова: фибриновый гель, роговица, эпителий, биотрансплантат

В докладе будет представлен оригинальный подход к созданию биотрансплантата из культивированных клеток эпителия губы на основе фибринового геля.

Целью создания биотрансплантата является его применение в офтальмологии для установления нового эпителиального покрова на роговице у пациентов с тяжелыми заболеваниями, затрагивающих оба глаза.

Будет представлена полная технологическая цепочка его получения: 1) оценка иммунофенотипа места биопсии; 2) влияние культуральных систем на клетки; 3) морфология, иммунофенотип и проточная цитофлуориметрия культивированных клеток; 4) технология сборки биотрансплантата; 5) жизнеспособность клеток в биотрансплантате; 6) моделирование выхода клеток.

ПОЛУЧЕНИЕ СЕКРЕТОМА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В БЕЗСЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

Т.Е. Гетманова, Ю.Р. Джумалиева, В.Р. Тагланов

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

e-mail: tgetmanova734@gmail.com

Ключевые слова: стволовые клетки производные нервного гребня, секретом NCSCs, экзосомы, безсывороточная среда.

Благодаря своей легкодоступности и высокой пластичности, аутологичные стволовые клетки производные нервного гребня (neural crest-derived stem cells, NCSCs) взрослого организма представляют собой идеальный вид клеток для использования в регенеративной медицине при восстановлении костно-хрящевых дефектов [1]. Применение бесклеточных технологий, в которых используются только внеклеточные продукты их жизнедеятельности, сопоставимо по эффективности с трансплантацией клеток и наряду с культивированием NCSCs в среде свободной от сыворотки представляется более биологически безопасным [2, 3].

Первичные культуры стволовых клеток производных нервного гребня (neural crest related stem cells, NCSCs) мыши культивировались в свободной от сыворотки среде DMEM при 37 °C и 10% CO₂ (опыт) и в аналогичных условиях с добавлением 10% FBS (контроль). Для получения

секретома NCSCs клетки помещались в стерильный раствор PBS на 24 ч при комнатной температуре, после чего отбирали супернатант с последующей фильтрацией и центрифугированием. Анализ содержания нуклеиновых кислот и белка проводили методом фотометрии. Фракция экзосом выделялась с использованием метода магнитной сепарации и анализировалась при помощи проточной цитометрии.

В опытной группе наблюдалось более низкое, по сравнению с контролем, содержание нуклеиновых кислот и белка в полученном секретоме (на 12,37% и 9,84%) и уменьшение фракции экзосом (на 14,81%), при этом статистически значимых различий обнаружено не было.

Таким образом, наши предварительные данные свидетельствуют в пользу возможности применения безсывороточной среды для культивирования NCSCs в целях получения их секретомы.

Литература:

1. Grimm W.D., Didenko N., Fritsch T et al. Biomedical Journal of Scientific and Technical Research. 2019. V. 17. № 2. P. 12732.
2. Zeuner, M.-T., Didenko, N.N., Humphries, D. et al. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2018. V. Apr 11. № 6. P. 39.
3. Диденко Н.Н., Серенко Т.В., Диденко М.О. Неделя науки — 2021. Материалы международного молодежного форума: Сб. науч. трудов. Ставрополь: СтГМУ, 2021. С. 356.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ

З.Е. Гилязиева, А.С. Пономарев, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: zegilazieva@gmail.com

Ключевые слова: микроокружение опухоли, клетки глиобластомы, аденокарцинома молочной железы, мезенхимные стволовые клетки, мембранные везикулы, цитохалазин В

Опухолевые клетки и их микроокружение постоянно взаимодействуют и влияют друг на друга через внеклеточные везикулы, к которым относятся мембранные везикулы или микровезикулы (МВ). Изучение влияния МВ на опухолевые сфероиды может предоставить новые данные, которые будут играть роль в развитии биологии опухоли. Целью работы является установить изменения, которые происходят в опухолевых сфероидедах под действием индуцированных цитохалазином В мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека (иМВ МСК) и клеток глиобластомы человека (иМВ SNB-19).

В этом исследовании клетки аденокарциномы молочной железы (MCF-7) использовались для создания опухолевых сфероидов в суспензии. Клетки глиобластомы (SNB-19) и мезенхимные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани, были использованы для выделения иМВ с помощью 10 мкг/мл цитохалазина В. Добавление иМВ SNB-19 и иМВ МСК к сфероидам проводили в концентрациях 5 мкг, 10 мкг и 20 мкг. Влияние иМВ анализировали с помощью конфокальной микроскопии, проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени. Кроме того, для анализа влияния цитохалазина В на везикулы было проведено их сравнение

с везикулами естественного происхождения (ЕВ) (без добавления цитохалазина В). ЕВ получали с помощью ультрацентрифугирования.

Для определения морфологии и размеров иМВ и ЕВ, выделенных из МСК и SNB-19 использовалась сканирующая электронная микроскопия, которая показала, что везикулы имеют округлую морфологию и размер иМВ МСК в среднем составляет 150 нм, а иМВ SNB-19 около 248 нм. Размер ЕВ, выделенных с помощью ультрацентрифугирования в среднем, составляет 148 нм для ЕВ МСК и 233 нм для ЕВ SNB-19. Полученные данные демонстрируют, что иМВ и ЕВ не отличаются размерами друг от друга. Было показано, что иМВ, как и ЕВ могут взаимодействовать с опухолевыми клетками MCF7 в монослойной культуре. Добавление иМВ МСК к данным сфероидом в концентрациях 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг увеличивало их количество. Окрашивание сфероидов Annexin V показало, что концентрация 20 мкг иМВ МСК снижает жизнеспособность опухолевых клеток в сфероидах. Добавление иМВ SNB-19 к опухолевым сфероидом MCF7 также увеличивало их количество, однако, концентрация 20 мкг иМВ SNB-19 увеличивала жизнеспособность опухолевых клеток в сфероиде по сравнению с иМВ МСК. Добавление иМВ МСК влияло на экспрессию генов *OCT4* и *NANOG* в сфероидах. При добавлении иМВ SNB-19 увеличивается экспрессия генов *OCT4* и *SOX2*. Также статистически достоверная разница в экспрессии гена *SLUG* по сравнению с контролем наблюдалась при добавлении иМВ SNB-19.

Таким образом, был проведен сравнительный анализ влияния иМВ МСК и иМВ SNB-19 на формирование и качество сфероидов. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030), за счет средств Российского научного фонда (грант № 21-74-10021).

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ, У ПАЦИЕНТОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

И.В. Гилевич^{1,2}, Е.А. Коломийцева¹, Э.Н. Шубров^{1,2}, С.Н. Лепетунов¹, Г.А. Забунян¹, Р.В. Чучварев¹

¹ ГБУЗ НИИ Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского МЗ КК, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

e-mail: giliv@list.ru

Ключевые слова: плазма, обогащенная тромбоцитами, лизат тромбоцитов, тромбгель, клиническое применение, хирургия

Плазма, обогащенная тромбоцитами (ОбТП) — фракция, выделенная из периферической крови, содержание тромбоцитов в которой превышает физиологический уровень. Считается, что концентрация тромбоцитов в ОбТП должна составлять не менее 1000000/мкл, больше или меньше не будет оказывать регенеративный эффект. По мнению Marx R.E. ОбТП может называться только тот продукт, в котором в небольшом количестве плазмы содержится увеличенное количество тромбоцитов. Перед введением тромбоциты дополнительно активируются (Ca²⁺, тромбин, температурный режим).

В нашем исследовании одной из задач стояло получение конечного продукта объемом 20–30 мл, соблюдая

необходимые требования. При этом важно было определить наиболее подходящий способ активации, что, прежде всего, было обусловлено точкой приложения, особенностями хирургического вмешательства. Разработанный нами протокол выделения ОбТП и ее активации обеспечивал следующие характеристики конечного продукта: объем конечного продукта составлял 20–50 мл, стерильный. Клеточный состав готового продукта: содержание тромбоцитов составляло, в среднем, $1098 \pm 58,68 \times 10^9$ /л, по сравнению с исходным уровнем — $312,3 \pm 16,62 \times 10^9$ /л, $p < 0,0001$, при этом отсутствовало содержание лейкоцитов и эритроцитов. Для получения ОбТП был отработан протокол двойного центрифугирования: сначала на мягком режиме, чтобы получить наибольшую концентрацию тромбоцитов в плазме, далее жесткий режим, для уменьшения объема ОбТП. С целью активации был использован режим глубокой заморозки при –80С, с последующим размораживанием и хранением при –20С. Другой способ был основан на введении CaCl₂ для активации аутологичного тромбина и далее смешивание тромбина с ОбТП для получения тромбгеля.

За период с 2017г. по 2021г. всего в исследовании приняло участие 166 человек с разной нозологией. В зависимости от заболевания пациенты были разделены на группы: стриктура уретры — 29 человек, интерстициальный цистит — 36 человек, трофическая язва — 46 чел., хронический остеомиелит нижних конечностей — 8 чел., 47 пациентов с дефектами лицевого скелета. Для заполнения костных полостей был использован тромбгель. Для лечения трофических язв тромбгель и лизат тромбоцитов, в урологии применяли лизат тромбоцитов, курсами. При анализе полученных данных побочные эффекты выявлены не были, у пациентов с интерстициальным циститом и трофическими язвами наблюдалась длительная ремиссия. При применении производных плазмы, обогащенной тромбоцитами, во время оперативных вмешательств сокращался восстановительный послеоперационный период, не было отмечено развития гнойных осложнений.

Таким образом, продукты из плазмы, обогащенной тромбоцитами, могут служить дополнительным способом стимуляции восстановления ткани и лечения тяжелых рецидивирующих заболеваний с нарушением процессов регенерации.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СОХРАНЕНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

И.В. Гилевич^{1,2}, Е.А. Коломийцева¹, В.Р. Потапова²

¹ ГБУЗ НИИ Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского МЗ КК, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

e-mail: giliv@list.ru

Ключевые слова: дермальные фибробласты, культивирование

В нашей работе мы анализировали влияние температурного режима и длительности хранения на функциональную активность клеток, подготовленных для использования (для экспериментального или клинического применения).

Для исследования были использованы дермальные фибробласты четвертого пассажа, культивированные при стандартных условиях в полной питательной среде,

состоящей из ДМЕМ (Gibco) и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). При достижении конфлюэнтности 80–90% флаконы с клетками обрабатывали трипсином-EDTA, ресуспендировали до гомогенной взвеси. В зависимости от ресуспендирующего раствора клетки были разделены на 3 группы: 1 группа: контрольная, клетки, ресуспендированные в растворе ДМЕМ и 10% ФБС; 2 группа: клетки, ресуспендированные в физиологическом растворе NaCl 0,9% и 10% альбумине; 3 группа: фибробласты, ресуспендированные в физиологическом растворе NaCl 0,9%. Каждая группа была подразделена на 3 подгруппы в зависимости от температурного режима хранения и длительности хранения: хранение при +4 °С в течение 3 часов и 24 часов; хранение при +24 °С в течение 3 часов и 24 часов; хранение при +37 °С в течение 3 часов и 24 часов.

Нами установлено, что при температурном режиме +4 °С количество клеток наиболее стабильно вне зависимости от ресуспендирующего раствора. Однако, при выборе наиболее оптимальных условий подготовки клеток необходимо учитывать и жизнеспособность клеток для чего был использован витальный краситель (трипановый синий). Помимо этого, при микроскопической оценке образцов учитывалось наличие агрегатов. При оценке этих двух параметров (жизнеспособность и агрегаты) наиболее удобоваримым оказались образцы, хранившиеся в растворах № 1 и № 2 при температуре +4 °С, в течение 3–24 часов. При температурном режиме +20 °С при длительном хранении появлялось значительное количество агрегатов, такие образцы не пригодны для использования. Вне зависимости от ресуспендирующего раствора при температуре хранения +37 °С образцы демонстрировали снижение жизнеспособности клеток на 30–50%, и при хранении 24 часа были выявлены во всех образцах сплошь агрегаты. Показано, что нахождение клеток в физиологическом растворе через 24 часа приводит к потере их жизнеспособности более, чем на 50%. Поскольку перед нами была поставлена задача определить наиболее приемлемые условия хранения суспензии фибробластов, в том числе и с целью клинической реализации, то считаем самым подходящим ресуспендирующий раствор № 2 (физиологический раствор 0,9% NaCl + альбумин 10%), так как в растворе № 1 содержится ксеногенный продукт (фетальная бычья сыворотка).

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили сделать нам вывод об условиях сохранения готовой суспензии дермальных фибробластов: ресуспендирующий раствор (физиологический раствор 0,9% NaCl + альбумин 10%), температура хранения +4 °С, время хранения: от 0 до 24 часов.

ПРИМАТЫ КАК ЛАБОРАТОРНОЕ ЖИВОТНОЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

И.В. Гилевич^{1,2}, И.С. Поляков^{1,2}, А.Л. Коваленко¹, Д.Д. Карал-оглы³, С.В. Орлов³, В.А. Порханов^{1,2}

¹ ГБУЗ НИИ Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского МЗ КК, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

³ ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия

e-mail: giliv@list.ru

Ключевые слова: дыхательная система, нечеловекообразные приматы, торакальная хирургия, регенерация

Анатомические параметры и максимальное соответствие функциональным параметрам является важным критерием при выборе вида животного для создания модели повреждения дыхательной системы. Выбор модели примата был основан на анатомическом сходстве дыхательной системы с человеческой, что позволит максимально точно воспроизвести все аспекты оперативного вмешательства на легких: выделение дыхательных путей и легких, технику наложения швов, перевязку сосудов. Для создания экспериментальной модели были выбраны нечеловекообразные приматы вида *Paro anubis* (павианы анубисы). Исследование было выполнено в условиях ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии». Данная работа была представлена 2 сериями экспериментов. Первым этапом моделировали повреждение трахеи с последующим ушиванием дефекта. Во второй серии экспериментов животным была выполнена левая пневмоэктомия под общей анестезией с вентиляцией одного легкого. Пневмоэктомию завершали формированием культы левого бронха. В зону дефекта трахеи и культю бронха вводили исследуемые продукты.

Эксперимент был выполнен на 11 половозрелых особях мужского пола, возрастом от 7 до 14 лет, весом — 22,4 ± 4,5 кг. 6 павианам была выполнена трахеотомия, 4 — пневмоэктомия. Весь период эксперимента животных содержали в индивидуальных клетках.

Животные были разделены на 2 группы: опытная и контрольная. Опытной группе вводили исследуемый клеточный продукт, контрольной группе — физиологический раствор NaCl 0,9%. В послеоперационном периоде проводили ежедневный мониторинг витальных функций. Согласно протоколу исследования животных выводили из эксперимента на 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки. Для оценки регенеративного потенциала ткани в области введения исследуемого продукта проводили забор образцов трахеи и бронхов с последующим гистологическим исследованием. Для оценки общеклинического состояния животного проводили забор периферической крови. В течение всего периода наблюдения приматы чувствовали себя удовлетворительно, сохраняли двигательную активность, осложнений зафиксировано не было.

Таким образом, использование приматов в качестве крупных лабораторных животных представляет интерес для проведения трансляционных исследований повреждений дыхательной системы и открывает новые возможности для доклинических исследований в области регенеративной медицины.

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ВИДЕ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.С. Глазьева¹, П.И. Макаревич¹, Н.А. Александрович¹

¹ Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

e-mail: n.alexandrushkina@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, клеточные пласты, регенеративная медицина

Наиболее изученными и перспективными объектами для эффективного восстановления поврежденных

тканей в области регенеративной медицины в настоящее время считаются мезенхимные стволовые клетки (МСК). Одним из революционных подходов, объединяющих в себе методологии тканевой инженерии и клеточной терапии, стало применение клеточных пластов (КП) — многослойных конструкций из клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса (ВКМ). МСК в составе КП характеризуются высокой жизнеспособностью, а наличие белков ВКМ и закоренных в нем растворимых факторов способствует большей эффективности при использовании таких конструкций в терапии заболеваний.

Несмотря на очевидный потенциал применения КП из МСК, на сегодняшний день существуют ограничения для их широкого применения. В первую очередь, КП из МСК очень гетерогенны по своему составу, т.к. формируемая МСК тканеинженерная конструкция представляет собой многослойный пласт с организованным ВКМ. В связи с этим формируемые КП из МСК трудно стандартизируемы, ведь получаемые из тканей доноров МСК зачастую сильно отличаются друг от друга. Уникальные свойства используемых МСК усложняют процесс получения готовых конструкций заданных характеристик в установленные сроки.

В работе был отработан протокол получения КП из МСК и проведена детальная характеристика МСК, использованных для получения тканеинженерных конструкций и их анализа. Сравнительный анализ МСК в составе монослоя и КП позволил выявить ключевые параметры, которые определяют сроки сборки. Было установлено, что культуры МСК с длительным временем лаг-фазы формируют КП в более длительные сроки, при этом зависимости от скорости роста клеточной культуры обнаружено не было. Методами качественного и количественного анализа было экспериментально установлено, что высокое содержание коллагена I типа и IV типа в культивируемых МСК также положительно коррелирует с длительными сроками сборки КП.

Результаты, полученные в данной работе, расширяют представление о механизмах, опосредующих сборку КП, что позволит разработать протоколы для получения в установленные сроки тканеинженерных конструкций заданных характеристик, пригодных для клинического применения. Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология»

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА И ВОЗРАСТНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

В.В. Глебов^{1,2}, В.В. Шевцов³, Е.В. Аникина³

¹ Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

² Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

e-mail: vg44 author1@mail.ru

Ключевые слова: регенерация клеток, сенесценция, физиологические механизмы, возрастные заболевания человека

В теле организма человека существует более трехсот различных типов функциональных клеток, которые выполняют различные функции: размножение, деления,

терминальные, дифференцированные, а также постмитотические клетки (нейроны, кардиомиоциты) и другие [2].

В ходе эволюции в организме человека сложились физиологические механизмы регенеративных процессов, которые позволяют обновлять клетки виде постоянно делящихся клеток, помогающие заменять отработанные и мёртвые клетки. Большую роль в этом играют стволовые клетки, которые могут не только делиться, но и становится клетками и исполнять те функции в тканях в которую они попадают [1].

Вместе с этим с возрастом отмечается сенесценция клеток, которые накапливаются в процессе старения, что ведет к генеративным нарушениям и неспособности к регенерации и обновлению клеток в теле организма. Это связано с каскадом физиологических процессов: увеличением роста провоспалительных цитокинов и металлопротеиназы, что ведет разрушению внеклеточного матрикса (ВКМ). Помимо этого, отмечается накопление нефункционирующих фибробластов в каждом покрове, разрастанию близлежащих предраковых клеток [3].

Важно отметить, что процессы старения происходят на всех уровнях организма человека и проявляются в виде увеличения атеросклеротических бляшек, артритно-атрозных нарушениях опорно-двигательной системы, в язвах кожного покрова и резком деление клеток и поражении печени и во внутренних железах организма человека [1–3].

Таким образом, физиологические механизмы регенерации клеток организма тесным образом связано с возрастными заболеваниями человека, при которых запускаются воспалительные процессы.

Литература:

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: «Наука», 2008. — т. 1 с. 465, т. 2, с. 473
2. Gomes N.M.V., Shay J.W., Wright W.E. (2010). Telomeres and Telomerase. *The Comparative Biology of Aging* (ed. Wolf N.S.). Springer, p. 227–259
3. Фаллер В.М. и Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М.: «Бином-Пресс», 2006. — 235 с.

БИОПЕЧАТЬ ТРЕХМЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И СФЕРОИДОВ ИЗ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Е.Г. Глинская¹, О.Н. Кошуба², А.Н. Копылов, С.Ш. Каршиева³, А.А. Левин³, С.В. Петров³, А.В. Ковалёв⁴, В.А. Миронов³, Е.В. Кудан³

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

³ НИТУ МИСиС, Москва, Россия

⁴ ФГБУ НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

e-mail: gliza@inbox.ru

Ключевые слова: сфероиды, коллаген, биопечать, хрящ, регенерация.

Лечение дефектов суставного хряща является одной из наиболее сложных задач современной ортопедии [1]. Новые перспективы в решении этой проблемы открылись с развитием тканевой инженерии и связаны с применением сфероидов, которые сохраняют функциональные характеристики хрящевой ткани и способны интегрироваться в нативную архитектуру хряща [2, 3].

В настоящей работе разработана методика биопечати тканеинженерных конструктов на основе коллагена и сфероидов из хондроцитов человека, предназначенных для замещения дефектов хряща.

На первом этапе были сформированы сфероиды из первичной культуры хондроцитов человека, используя различные концентрации клеток, и изучена кинетика изменения их диаметров на протяжении 9 дней. Для всех концентраций наблюдалось формирование сфероидов правильной формы приблизительно одного размера в рамках одной концентрации. В процессе культивирования происходило постепенное уменьшение диаметров сфероидов.

Для характеристики биологических свойств сфероидов была изучена кинетика их слияния, расплывания, а также биомеханические свойства. Все сфероиды демонстрировали эффективное слияние и расплывание, скорость которого была обратно пропорциональна первоначальной концентрации клеток. Оценка биомеханических свойств сфероидов показала, что в процессе культивирования происходит увеличение прочности сфероидов, свидетельствующее о накоплении внеклеточного матрикса.

С помощью биопринтера «Фабрион» были напечатаны трехмерные конструкты на основе коллагенового гидрогеля и сфероидов из хондроцитов человека. Во фрагментах хряща были сформированы дефекты круглой формы диаметром 12 мм и глубиной 3–5 мм, в полость которых была напечатана коллагеновая решетка со сфероидными ячейками. Фрагменты хряща, содержащие конструкты, были подкожно имплантированы иммунодефицитным мышам на срок 1 месяц, после чего с помощью гистологического анализа была проведена оценка регенеративных свойств напечатанных конструктов.

Проведенные исследования имеют как теоретическое, так и практическое значение и могут лечь в основу технологии замещения дефектов хрящевой ткани.

Литература:

1. Еремеев А.В., Зубкова О.А., Ручко Е.С. и др. Медицина экстремальных ситуаций. 2020. Т. 4. № 22. С. 59.
2. Schubert T., Anders S., Neumann E., et al. International Journal of Molecular Medicine. 2009. V. 23. № 4. P. 455.
3. Baptista L.S., Silva K.R., Pedrosa C.S. et al. Artificial Organs. 2013. V. 37. № 12. P. 1068.

АПЛИКАЦИОННОЕ И ГИДРОПРЕССИВНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРОДНОЙ ВОДЫ В ЛЕЧЕНИИ РАН МЯГКИХ ТКАНЕЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А.А. Глухов, А.А. Андреев, П.А. Коновалов, С.С. Захарова, Н.О. Михайлов

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

e-mail: Dr.kon68@gmail.com

Ключевые слова: применение водородной воды, раны мягких тканей.

Дефекты мягких тканей ежегодно диагностируются в мире у 5,5 млн больных. Нагноение ран являются в Российской Федерации причиной половины случаев обращения пациентов за хирургической помощью. На сегодняшний день рынок средств, используемых на лечение ран мягких тканей, превышает 15 млрд \$, на профилактику развития рубцов и шрамов — 12 млрд \$. Суммарные расходы в мире на лечение ран мягких тканей по некоторым оценкам почти достигают 100 млрд \$.

Цель исследования — улучшение показателей лечения ран мягких тканей за счет аппликационного и гидропрессивного применения водородной воды.

Материалы и методы: исследование в первом и втором блоках было направлено на изучение воздействия водородной воды на протекание раневого процесса в асептических и гнойных ранах, соответственно. Лечение раневого процесса осуществляли во 2-й и 3-й контрольных группах аппликационным и гидропрессивным применением 0,9% раствора хлорида натрия, в опытных группах — водородной воды. Гидропрессивная санация осуществлялась при помощи специального устройства — источником гидроимпульсного потока жидкости (до 7 атм.), разработанного вместе с КБ «Химавтоматика» (г. Воронеж).

Оценка течения раневого процесса в экспериментальном исследовании проводилась с помощью объективных, лабораторных, микробиологических, гистологических, морфометрических и статических методов.

Результаты и их обсуждение: Аппликационное применение водородной воды в общем лечении ран мягких тканей способствовало ускорению заживления раневого процесса 1-й и 2-й фаз в среднем на 1,1–1,7 и 1,1–1,3 раза соответственно, в сравнении с данными в 1-й контрольной группе. Аппликации водородной водой при лечении чистых ран показали наилучшие показатели лечения по сравнению с контрольными группами и 2-й опытной, что по всей видимости обусловлено противовоспалительными и антиоксидантными свойствами H₂ воды. Гидропрессивная обработка H₂ водой (2-я опытная группа) показала лучшие результаты в лечении гнойных ран, по сравнению с аппликацией и обработкой 0,9% р-ром NaCl, что обусловлено более качественным очищением раны высоконапорным потоком жидкости. Во время лечения гнойных ран — более быстрое купирование отека, ускорение формирования фибрина и коллагена, эпидермиса и восстановления мышечной ткани.

Вывод: Предварительные исследования показали безопасность и эффективность аппликационного и гидропрессивного применения водородной воды в лечении ран мягких тканей.

Литература:

1. Лобас С.В., Глухов А.А., Микулич Е.В., Алексеева Н.Т. Журнал анатомии и гистопатологии. — 2014. — Т. 3, № 1 (9). — С. 33–36.
2. И.П. Мошуров и др. Системный анализ и управление в биомедицинских системах — 2008. — Т. 7, № 1. — С. 106–110
3. Бейзеров Ю.М. Хирургическое лечение ран: современные подходы / Бейзеров Ю.М. [и др.] Хирургия Восточная Европа. — 2012., № 3. — С. 286–287.
4. Li G., Yang M., Yang N.-N., Yin X.-X., Song W.-g. 2017. Oncotarget. 8 (60): 102653–102673.
5. А.А. Глухов, Н.Т. Алексеева, А.В. Лобцов. Вестн. экспериментальной и клинической хирургии. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 133–145.
6. А.А. Глухов, В.В. Новомлинский, В.М. Иванов. Вестн. экспериментальной и клинической хирургии. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 122–128.
7. Qiu P., Liu Y., Zhang J. 2019. International journal of biological sciences. 15 (6): 1261
8. Saramago E.A., Borges G.S., Singolani Jr C.G., Nogueira J.E., Soriano R.N., Carnio E.C., Branco L.G. 2019. Brain, behavior, and immunity. 75: 119–128.
9. Андреев А.А., Лаптиёва А.Ю., Глухов А.А., Коняшин Д.А., Коновалов П.А., Золотухин В.О. 2021. Актуальные проблемы медицины. 44 (4): 460–470. DOI: 10.52575/2687-0940-2021-44-4-460-470.

ОСОБЕННОСТИ КОРРОЗИИ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ: *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЯ, ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

**А.С. Гнеденков, С.Л. Синебрюхов,
В.С. Филонина, С.В. Гнеденков**

*Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт химии ДВО РАН,
Владивосток, Россия*

e-mail: asgnedenkov@mail.ru

Ключевые слова: магниевый сплав, среда для культивирования клеток, биорезорбция, скорость коррозии, локальные электрохимические методы, механизм коррозии, имплантационная хирургия, защитные биоактивные покрытия

Проведен сравнительный анализ коррозионной активности биорезорбируемого сплава магния МА8 (система Mg-Mn-Ce) и Mg-O,8Ca в физиологических средах (среда для культивирования клеток млекопитающих — Minimum Essential Medium (MEM) и водном растворе NaCl). Установлено влияние состава, микроструктуры и неоднородности биорезорбируемого магниевое сплава на его коррозионные характеристики на микро- и мезоуровне с помощью локальных электрохимических методов, гравиметрического анализа скорости коррозии, традиционных электрохимических испытаний и анализа химического состава поверхности материала. Кальцийфосфатные соединения являются основными продуктами, образованными на поверхности магниевое сплава, выдержанного в среде MEM. Предложена модель механизма коррозии сплава магния в MEM, включающая три стадии развития поверхностной пленки. Построена диаграмма, позволяющая определить возможные реакций, протекающие на поверхности сплава магния в MEM, и термодинамическую вероятность образования химических соединений на основании значений локального pH [1–3].

Проведена сравнительная оценка особенностей протекания коррозионного процесса на микроуровне на образцах сплава с естественной оксид/гидроксидной пленкой и с базовым покрытием, сформированным методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО). Установлен механизм биодеградации сплавов с гидроксиапатитсодержащим ПЭО-покрытием в среде MEM. В порах и на поверхности ПЭО-покрытия защитного слоя выявлено образование гидроксиапатитсодержащих продуктов в результате ионного синергетического взаимодействия между подложкой сплава магния, ПЭО-покрытием и компонентами среды MEM. Проведена модификация ПЭО-слоя электрофоретическая обработка ПЭО-слоя с использованием биополимера. Композиционные защитные слои ограничивают доступ агрессивной среды к материалу, повышая защитные антикоррозионные свойства покрытий, с одной стороны, и, за счет своего уникального состава, будут ускорять рост костной ткани, с другой, что позволяет рассматривать такие сформированные материалы как перспективные для имплантационной хирургии [4,5].

Электрохимические измерения проведены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-73-10148. Формирование покрытий и анализ состава поверхности выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 20-13-00130.

Литература:

1. Gnednikov A.S., Lamaka S.V., Sinebryukhov et al. Corros. Sci. 2020. V. 168. P. 108552.
2. Gnednikov A.S., Sinebryukhov S.L., Filonina V.S., et al. J. of Magnes. Alloy. 2022. V. 10. P. 1326.
3. Gnednikov A.S., Mei D., Lamaka S.V., et al. Corros. Sci. 2020. V. 170. P. 108689.
4. Gnednikov A.S., Lamaka S.V., Sinebryukhov S.L., et al. Corros. Sci. 2021. Vol. 182. P. 109254.
5. Gnednikov A.S., Sinebryukhov S.L., Filonina V.S., et al. J. of Magnes. Alloy. 2022. In Press.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ YAP1 В РАЗНЫХ ТИПАХ ОРГАНОИДОВ ПОСТНАТАЛЬНЫХ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ

**И.А. Говорова, С.Ю. Никиточкина, О.И. Сутягина,
О.Л. Черкашина, Е.А. Воротеляк, А.Л. Риппа**

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

e-mail: ischenko.i.a@gmail.com

Ключевые слова: эпителий легких, органоиды, YAP1, вертепорфин.

Сигнальный путь Hippo и транскрипционный ко-активатор YAP1 оказывают непосредственное влияние на пролиферацию и дифференциацию клеток в различных органах, в том числе легких. Ядерно-цитоплазматический сдвиг YAP1, который свидетельствует об активации его сигнального пути и одновременной репрессии пути Hippo, в развивающихся легких мышей играет важную роль в регулировании ветвления и нормального развития проксимального и дистального отделов легких [1, 2]. В ходе эмбриогенеза YAP1 экспрессируется в ядрах эпителиальных клеток альвеол, а в респираторном эпителии обнаруживается преимущественно в цитоплазме. В настоящее время, влияние ядерно-цитоплазматического сдвига YAP1 на функционирование и регенеративные способности клеток легких в постнатальном развитии мало изучены.

В качестве модели исследования были использованы органоиды легких мыши, полученные из клеточной суспензии легких неонатальных мышей и культивируемые в матригле. Органоиды были визуально разделены на три группы: 1 — крупные, полые, округлые; 2 — малые, неполье, округлые; 3 — среднего размера, неполье, не округлые. ИГХ анализ подтвердил разделение органоидов по типам и выявил экспрессию маркеров клеток верхних дыхательных путей (секретоглобин), а также альвеолярного эпителия (аквапорин 5). Таким образом, полученные органоиды были разделены на бронхиолярные, альвеолярные и смешанного типа, что согласуется с литературными данными [3].

Для исследования влияния YAP1 на развитие разных типов органоидов был использован ингибитор YAP1 — вертепорфин (ВТП). Экспрессия YAP1 оценивалась в трех типах органоидов с помощью ИГХ и программных методов количественного подсчета уровня ядерной экспрессии. При добавлении ВТП (концентрации 1 мкМ; 1,5 мкМ), количество бронхиолярных органоидов уменьшается по сравнению с контролем, при этом количество органоидов альвеолярного типа снижается не существенно. Уровень экспрессии YAP1 в ядрах клеток альвеолярных органоидов статистически достоверно выше, чем в бронхиолярных органоидах в контроле. Однако в присутствии ВТП уровень ядерного

YAP1 в бронхиальных органоидах статистически значительно повышается с ростом концентрации ВТП. Вероятно, при добавлении ВТП нарушается механизм, контролирующий ядерно-цитоплазматическое перемещение YAP1 в клетке, происходит подавление развития бронхиального типа органоидов и накопление YAP1 в ядрах бронхиального эпителия.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30015).

Литература:

1. Mahoney J.E., Mori M., Szymaniak A.D., Varelas X., Cardoso W.V. *Developmental cell*. 2014. V.30. № 2. P.137–150.
2. Gokey J.J., Snowball J., Sridharan A., Sudha P., Kitzmiller J.A., Xu Y., Whitsett J.A. *iScience*. 2021. V.24. № 9. 102967
3. Ng-Blichfeldt J., Schrik A., Kortekaas R.K., et al. *EBioMedicine*. 2018. V.36. P.461–474.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОМИОЦИТОВ С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ ФИЛАМИНА С (FLNC) ИЗ ИПСК ПАЦИЕНТА С РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Д.В. Голиусова^{1,2}, И.В. Копылова¹, М.В. Терякова¹, О.С. Лебедева^{1,3}, М.А. Лагарькова^{1,3}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, Россия

e-mail: daria.goliusova@mail.ru

Ключевые слова: рестриктивная кардиомиопатия, филламин С, ген FLNC, клеточная модель *in vitro*, кардиомиоциты, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), дифференцировка.

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) — это редкая тяжелая форма патологии миокарда с ранним возрастом манифестации и плохим прогнозом. По данным ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в России доля детей с РКМП составляет 3% от всех случаев генетически обусловленных кардиомиопатий [1]. В основе патогенеза заболевания лежит ограничение наполнения желудочков сердца кровью, вызванное повышением жесткости и снижением пластичности миокарда. Большинство случаев РКМП являются идиопатическими и обусловлены мутациями в генах саркомерных и цитоскелетных белков. Недавно была установлена роль гена филламина С (FLNC), кодирующего актин-связывающий белок, в развитии РКМП. Однако, механизмы влияния мутаций филламина С на структуру и функции кардиомиоцитов остаются неизвестными [2]. На сегодняшний день в мире работы по изучению FLNC-ассоциированной РКМП на модели кардиомиоцитов человека *in vitro* единичны. В настоящей работе была получена клеточная модель кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК пациента с подтвержденной мутацией c.7416_7418delGAA в гене FLNC и диагнозом РКМП, а также из ИПСК здорового донора. Кардиомиоциты экспрессировали основной маркер зрелых кардиомиоцитов — сердечный тропонин Т, и сохраняли способность к сокращению в культуре на протяжении двух месяцев культивирования, в том числе после процедуры замораживания. Таким образом, полученная клеточная модель на основе дифференцированных

производных ИПСК представляет большой интерес как для раскрытия фундаментальных механизмов, приводящих к развитию рестриктивного фенотипа миокарда при РКМП, так и для поиска мишеней специфической терапии в данной группе пациентов. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература:

1. Савостьянов К.В., Басаргина Е.Н., Рябова Е.Е. и др. *Рос. кардиол. журн.* 2021. Т. 26. № 10. С. 52.
2. Song S., Shi A., Lian H. et al. *Heart Fail. Rev.* 2021. V. 27. P. 1373.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ БИОПЕЧАТИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ГЛУБОКИХ ОЖОГОВ

К.П. Головки¹, В.Н. Александров^{1,2}, И.А. Барсук¹

¹ ФГБВОУ ВО ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: barsuk202220@gmail.com

Ключевые слова: аутодермопластика, биопечать, биочернила, гидрогель, ожоговая травма, репаративная регенерация, хитозан.

Трехмерная (3D) биопечать стала многообещающей технологией для воспроизводства тканей и органов с высоким уровнем контроля над геометрией и микроархитектурой получаемых изделий. Новые биочернила и фотосшиваемый гидрогель для тканевой инженерии стали ключом к разработке ряда биоинженерных конструкций, не исключая таковых и для пластики дефектов кожи.

Фотосшиваемый гидрогель на основе хитозана — один из самых перспективных материалов для тканевой инженерии органов и тканей. Его биосовместимость, относительная простота изготовления, а также контролируемые механические, реологические и биodeградационные свойства соответствуют современным комплексным требованиям к полнослойным конструкциям, например биоинженерным конструкциям для лечения глубоких ожоговых ран.

В ходе нашего исследования был создан образец, напечатанный при помощи 3D-биопринтера Rokit Dr. INVIVO 4D2, с использованием 3-х типов биочернил на основе 4% раствора среднемолекулярного хитозана и соответственно 3-х разных видов клеток (кератиноциты, дермальные фибробласты, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани). Данная структура, по своим свойствам и микроархитектонике, максимально повторяет естественную ткань кожи. Она способна к самоподдержанию и росту, а также, в отличие от традиционных перевязочных средств, не требует замены в течение всего периода заживления глубокой ожоговой раны. В текущий момент времени проводятся испытания полученных образцов на мелких лабораторных животных (крысах).

Использование созданных тканеинженерных конструкций, созданных при помощи трехмерной биопечати в комплексном лечении глубоких ожогов создает условия для улучшения исходов их лечения, позволяет решить проблему нехватки донорских ресурсов и избежать осложнений, свойственных методам кожной аутодермопластики.

ОСОБЕННОСТИ МИОСАТЕЛЛИТОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МЫШЦ ПРИ ТРЕНИРОВКАХ, ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ И ПРИЕМЕ АМИНОКИСЛОТ

Е.С. Головнева^{1,2}, Р.В. Тахавиев², Г.В. Брюхин¹

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

² ГБУЗ Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск, Россия

e-mail: micron30@mail.ru

Ключевые слова: миосателлитоциты, тренировка; лазерная терапия; аминокислоты

Мышцы различных групп формируют отличающиеся друг от друга паттерны регенеративного ответа на физическую нагрузку, включающие реакцию миосателлитов. Известно, что лазерное воздействие и прием аминокислот с разветвленной цепью (ВСАА) могут воздействовать на процессы гиперплазии и гипертрофии мышцы в условиях тренировки [1,2], при этом особенности реакции миосателлитов различных групп мышц на комбинированную стимуляцию лазером и аминокислотами не изучались.

Целью исследования явился анализ влияния инфракрасного лазерного воздействия и ВСАА на миосателлитоциты различных мышечных групп при принудительном плавании. Эксперимент был выполнен на 30 крысах Wistar, разделенных на 5 групп: 1) интактный контроль, 2) тренировки принудительным плаванием, 3) тренировки с приемом аминокислот с разветвленной цепью, 4) тренировки с инфракрасным лазерным воздействием, 5) тренировки с лазерным воздействием и приемом аминокислот с разветвленной цепью. Животные выводились из эксперимента через 6 недель после начала тренировок. Изучались гистологические препараты *m. biceps femoris*, *m. pectoralis major*, *m. triceps brachii*, анализировали количество миосателлитоцитов и площадь их ядер.

Принудительное плавание в течение 6 недель не приводило к статистически значимым изменениям количества и площади ядер миосателлитов. Площади ядер миосателлитов в разных мышечных группах не отличались, а количество миосателлитов было выше в *m. triceps brachii*. После стимуляции регенерации лазерным воздействием наиболее выраженные изменения как количества миосателлитов, так и площади ядер наблюдались в *m. biceps femoris*, а при приеме ВСАА количество миосателлитоцитов было значительно выше в *m. triceps brachii*. В группе комбинированного применения инфракрасного лазерного облучения и ВСАА происходило более выраженное увеличение площади ядер миосателлитоцитов и их количества, чем при изолированной лазерной терапии, либо приеме аминокислот. В *m. pectoralis major* увеличение площади ядер миосателлитов было выражено слабее относительно других групп мышц, при этом количество клеток увеличивалось сопоставимо. Таким образом, лазерное воздействие на мышцы в комбинации с приемом ВСАА стимулирует ответные реакции миосателлитов в тренировочном процессе, при этом наибольшая эффективность регенеративного процесса наблюдается в мышцах конечностей.

Литература:

1. Галлямудинов Р.В., Астахова Л.В., Головнева Е.С., Серышева О.Ю. Лазерная медицина. 2020. Т. 24. № 2–3. С. 90.
2. Ra S.G., Miyazaki T., Kojima R.J. Sports Med. Phys. Fitness. 2018. V. 58 (11). P. 1582.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ НИШИ СЕРДЦА ПУТЕМ ОБОГАЩЕНИЯ КАРДИОСФЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Ю.Д. Гольцева, К.В. Дергилев, А.А. Гусева, М.А. Болдырева, Е.В. Парфенова, И.Б. Белоглазова

ФГБУ НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: eleagnusom@gmail.com

Ключевые слова: сфероид, кардиосферы, периваскулярная ниша, эндотелиальные клетки.

В сердце периваскулярная ниша формирует микроокружение сосуда и участвует в регуляции гомеостаза и репаративных процессах. Данную регуляцию обеспечивает взаимодействие компонентов периваскулярной ниши: эндотелиальных клеток, пероцитов, фибробластов и формируемого ими матрикса, за счет паракринной и межклеточной передачи сигналов. Для изучения механизмов функционирования периваскулярной ниши и возможных способов воздействия необходимо наличие адекватных 3D клеточных моделей, обогащенных сосудистыми клетками. В связи с чем целью нашей работы было разработать метод получения 3D модели периваскулярной ниши сердца.

Модель периваскулярной ниши разрабатывали на основе сфероидов (кардиосфер), полученных из кардиальных клеток (КК) и эндотелиальных клеток (ЭК). КК получали методом эксплантной культуры из сердец мышей линии C57Bl/129 и культивировали в среде IMDM, содержащей 20% сыворотки, на фибронектине. ЭК получали путем ферментативной диссоциации сердечной ткани (1 мг/мл коллагеназа А, 30 мин при 37 °С) с последующей иммуномагнитной селекцией по маркеру CD31, и культивировали в среде EGM2-MV на желатине. Для обогащения кардиосфер эндотелиальными клетками ЭК и КК комбинировали (3:50, 1:5 и 2:5) и культивировали в планшетах с низкоадгезивным U-образным дном (Nunc) в среде для кардиосфер (35% IMDM, 65% DMEM/F-12, 3% сыворотки) в течение 3 дней. Характеристику обогащенных ЭК кардиосфер выполняли путем иммунофлуоресцентного окрашивания и оценки проангиогенных свойств по способности формировать «сосудистую сеть» в фибриновом геле и секретировать факторы-регуляторы ангиогенеза (ProteomeProfiler antibody array).

Мы показали, что разработанный нами протокол позволяет формировать обогащенные ЭК кардиосферы независимо от доли ЭК. При этом монокультура ЭК не способна к формированию сфероидов. В составе обогащенных ЭК кардиосфер визуализировали эндотелиальные (CD31) и гладкомышечные (SMA) клетки, а также компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, ламинин). Анализ секретома обогащенных сфероидов показал наличие факторов-регуляторов ангиогенеза (MCP-1, MIP-1 α , MMP3 и др.). При этом способность обогащенных ЭК кардиосфер формировать сосудистые структуры (число и длина отростков) была выше, чем монокультуры ЭК. Данные результаты свидетельствуют о сохранении в обогащенных ЭК кардиосферах принципов взаимной регуляции, характерных для периваскулярной ниши.

Таким образом, мы разработали 3D клеточную модель периваскулярной ниши в сердце. Обогащенные ЭК кардиосферы обеспечивают сохранение основного состава и специализированных межклеточных и секреторных взаимодействий сосудистого микроокружения, что позволяет использовать данную модель для изучения

механизмов функционирования и регуляции периваскулярной ниши сердца. Работа выполнена при финансировании гранта РФФ № 21-15-00327.

ОСОБЕННОСТИ ПАРАКРИННОГО ПРОФИЛЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

А.Н. Горностаева, А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова

ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

e-mail: Hindlll@yandex.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, воспаление, лимфоциты, паракринные медиаторы

МСК (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) являются востребованным инструментом регенеративной медицины. Они обладают высокой пролиферативной и паракринной активностью, иммуноуклончивостью, способностью к мультилинейной дифференцировке и модулируют иммунный ответ. Это делает возможным применение аллогенных MSC для регенерации тканей и снижения острых воспалительных процессов. Терапевтический эффект MSC чаще всего достигается за счёт их паракринной активности, при этом состав секретора в большой степени зависит от экзогенных факторов.

В исследовании изучался паракринный профиль MSC в условиях провоспалительного микроокружения. MSC жировой ткани человека 72 часа сокультивировали с мононуклеарами периферической крови (МНК) человека и популяциями ЕК и Т-клеток. МНК и Т-клетки стимулировали фитогемагглютинином 10 мкг/мл, а ЕК — IL-2 и IL-15 (20 и 10 нг/мл соответственно).

При сокультивировании существенно ($p < 0,05$) повышалась секреция MSC факторов роста: FGF-2, fractalkine, eotaxin, G-CSF, VEGF. При этом продукция EGF, TGF- α и PDGF-AB/BB не изменялась. Концентрация GRO, IL-6 и IL-8 в среде от сокультуры возрастала по сравнению с монокультурой MSC. В среде от стимулированных МНК также обнаружился высокий уровень этих факторов, в частности, GRO синтезируется макрофагами. В эксперименте с сепарированными популяциями ЕК и Т-клеток удалось установить, что продукция GRO увеличивается за счёт вклада MSC. С помощью ПЦР-анализа показано, что экспрессия генов IL6 и IL8 в MSC после сокультивирования увеличивалась в 10 и 200 раз, соответственно. Кроме того, выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих иммуномодуляторные медиаторы IDO и PGE2. При сокультивировании с выделенными популяциями иммунных клеток было обнаружено, что, помимо увеличения продукции описанных выше медиаторов, возрастала секреция EGF и PDGF-AB/BB при взаимодействии с обоими типами клеток, а TGF- α — только с ЕК. При этом эффекты по остальным медиаторам также отличались: кратность увеличения продукции PDGF-AB/BB и FGF-2 MSC в сокультуре с ЕК была в 5 раз больше, чем при взаимодействии с Т-клетками. Увеличение VEGF было более выражено (в 6 раз) в сокультуре MSC и Т-клеток.

Таким образом, в ответ на провоспалительное микроокружение MSC выделяют широкий спектр растворимых медиаторов, включающий в себя, как провоспалительные цитокины, так и факторы роста и иммуносупрессивные медиаторы. Уровень продукции этих факторов зависит от типа иммунных клеток, с которым происходит взаимодействие.

В целом, можно говорить не только о проявлении иммуносупрессивных свойств MSC, но и об увеличении регенеративного потенциала MSC под воздействием микроокружения, сформированного провоспалительно-активированными иммунными клетками. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04026.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ БИОМЕХАНИЧЕСКОГО НЕСООТВЕТСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА И АРТЕРИАЛЬНОГО СОСУДА

А.Ю. Городков¹, Т.Х. Тенчурин², С.В. Крашенинников², Ш.Т. Жоржолани¹, Ю.М. Цыганков¹, А.Д. Шепелев², В.Г. Мамагулашвили², С.Н. Чвалун²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Минздрава России, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: agorodkov@bk.ru

Ключевые слова: аорта, протез кровеносных сосудов, электроформование, механические свойства, гистологические исследования.

Известно, что упругость аорты переменна вдоль ее длины [1]. Это, в сочетании со сложной конфигурацией проточного канала аорты, должно обеспечивать условия самоорганизации смерчеобразной структуры потока крови [2,3]. В литературе практически отсутствуют сведения о попытках воспроизвести упруго-прочностные свойства нативной аорты или артерий в синтетическом матриксе.

Использование при изготовлении протезов кровеносных сосудов (ПКС) технологии электроформования сделало возможным получение матрикс с заданными свойствами, приближающими их к нативным тканям [4].

Выбор полимера для изготовления ПКС играет важнейшую роль. Одними из перспективных полимеров считаются поликапролактон (ПКЛ) (жесткий, неэластичный материал), и сополимер винилиденфторид с гексафторпропиленом (СКФ-26) (каучукоподобный полимер) [5].

Из указанных материалов методом электроформования были изготовлены прототипы ПКС, которые имплантировали в брюшную аорту свиней на срок три месяца. Прорастание протезов оценивали на основании гистологического исследования капсулы. Соответствие свойствам нативной ткани оценивали по изменению механических свойств до и после имплантации.

На микропрепаратах показано, что в случае ПКС из ПКЛ капсула практически не структурирована, не содержит слоев клеток. Ткань капсулы незрелая, содержит большое количество клеток лимфогистиоцитарного ряда, фибробласты расположены хаотически. ПКС из СКФ-26 формирует капсулу, в которой стенка имеет слоистую структуру. Она имеет эндотелизованную внутреннюю поверхность. Внутренняя капсула содержит слои гладкомышечных клеток, ориентированных вдоль и по окружности протеза. Неoadвентиция состоит из зрелой соединительной ткани.

Такое различие в процессах прорастания прототипов ПКС клетками нашло свое отражение и в изменении механических свойств. Так у ПКС из ПКЛ прочность упала в 2 раза, модуль упругости и деформация разрушения снизились на 38 и 22% соответственно. В тоже время

прочность ПКС из СКФ-26 после имплантации не изменилась, а модуль упругости и деформация разрушения снизились на 15 и 25% соответственно.

Полученные результаты показывают, что выбор материала и технологии изготовления позволяют воспроизвести биомеханические свойства артериального сосуда в конструкции синтетического сосудистого протеза. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00148

Литература:

1. Zhorzholiani Sh.T., Talygin E.A., Krashennnikov S.V. et al. Human Physiology. 2018. V. 44. № 5. P. 532.
2. Bockeria L.A., Kiknadze G.I., Gachechiladze I.A. et al. Cardiommetry Journal. 2013. № 3. P. 5.
3. Жоржوليани Ш.Т., Миронов А.А., Талыгин Е.А. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 10. С. 519.
4. Rim N.G., Shin C.S., Shin H. Biomed Mater. 2013; V. 8. 014102.
5. Gorodkov A. Yu., Zhorzholiani Sh. T., Agafonov A.V. et al. Fibre Chemistry. 2019. V. 50. P. 556.

СФЕРОИД КАК НОВЫЙ ОБЪЕКТ ПАТЕНТНОГО ПРАВА

В.А. Горшков-Кантакузен

¹ ФГБОУ ВО Российская государственная академия

интеллектуальной собственности, Москва, Россия

² Gesellschaft für Rechtsvergleichung e.V., Фрайбург, Германия

e-mail: cantacuzene.patent@gmail.com

Ключевые слова: сфероид, патент, формула, интеллектуальная собственность

Введение. Одним из приоритетных направлений развития отечественной медицинской науки, согласно Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года (утв. распоряжением Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 2580-р), является создание биомедицинских клеточных и тканеинженерных конструкций. Одним из видов таких конструкций является сфероид животных клеток, который представляет собой агрегат клеток (чаще сферической формы), состоящий из одного или нескольких видов клеток, находящихся в различных состояниях (пролиферирующие, спокойные, и т. д.), и, необязательно, содержащий матрикс. Появление первых заявок на патент как по процедуре PCT (PCT/JP 2003/011471; публикация WO 2004035101 A1, 29.04.2004), так и на национальном уровне (RU 2019134905 A1, 30.10.2019) вызывает сложности для заявителей и специалистов, поскольку в национальных патентных законодательствах не определены «специфические» требования, позволяющие описать их сущность, что необходимо в виду сложности объектов. Руководство заявителей только общими требованиями к патентным объектам приводит к ситуации, когда даже поданная по процедуре PCT заявка либо не переходит на национальную фазу (PCT/GB 1998/000343; публикация WO 1998035021 A1, 13.08.1998), либо уже на национальной фазе во всех странах выносятся решения об отказе в выдаче патента на изобретение (PCT/EP 2017/070881; публикация WO 2018036910 A1, 01.03.2018).

Цель. Целью настоящего исследования является определение «специфических» требований для данного объекта в виде существенных признаков формулы

изобретения, поскольку биологические объекты, по крайней мере в отечественном законодательстве, всегда характеризуются «специфическими» требованиями к их раскрытию и отражению этой специфики в формуле изобретения в качестве существенных признаков.

Материалы и методы. Основным методом является анализ международного опыта рассмотрения заявок на данные объекты, в т.ч. переписка между патентным экспертом и заявителем, приведшая к принятию решения об отказе в выдаче патента (по системе Global Dossier), специализированная научная литература.

Результаты. Анализ заявок, формула которых содержит объект сфероид животных клеток (продукт), показал, что чаще всего заявители указывают либо на клеточный состав сфероидов (US 20160022870 A1, 28.01.2016; KR 10-2019-0059864 A, 22.11.2018), либо на свойства, которые приобрел сфероид (EP 3287521 A1, 28.02.2018). При этом, по таким заявкам делопроизводство либо еще ведется, либо прекращено по причине отсутствия ясности и достаточности раскрытия (т.е. принято решение об отказе в выдаче патента на изобретение). Таким образом, проанализировав международный опыт и основываясь на данных специализированной научной литературы, для сфероидов как биологического объекта, предложен следующий набор существенных признаков: используемая линия (или линии) клеток (и пространственная организация слоев клеток внутри сфероидов), питательная среда, матрикс (при его наличии), форма, диапазон размеров и иные признаки, характеризующие новые функции клеток, возникшие в результате образования сфероидов. Указанное предложено для включения в действующие отечественные нормативные правовые акты в области патентования изобретений.

ВЕКТОРНЫЕ МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДИНАМИКИ НЕЙРОМОРФОГЕНЕЗА И ВЕРИФИКАЦИИ ЕГО ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ: КОЛОКАЛИЗАЦИЯ МОДЕЛЬНЫХ ВЕКТОРНЫХ ПОЛЕЙ ГАЛЬВАНТАКСИСА И ИЗМЕРЕННЫХ МГНОВЕННЫХ ПОЛЕЙ СКОРОСТЕЙ АКСОНАЛЬНЫХ ПОТОКОВ

О.В. Градов

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

e-mail: gradov.chph.ras@gmail.com

Ключевые слова: аксональный поиск пути; аксональное наведение; биоэлектростатическая регуляция; коннектом; нейробласт; нейроморфогенез; мгновенные поля скоростей тока; PV.

Так как, согласно ряду общеизвестных биофизических моделей, развитие нейронов управляется электрофизиологической функцией их предшественников при развитии последних, понятно, что, моделируя и визуализируя их электрическое поле при росте отростков, начиная со сферического нейробласта как модели точечного заряженного источника, можно получить представление о направлении роста отростков нейрона при его морфогенезе из нейробласта [1,2]. В связи с этим нами было осуществлено моделирование электрических полей групп нейронов (с графической визуализацией в виде силовых линий и векторных полей) и отдельных нейронов на разных стадиях нейрогенеза (начиная с нейробластов), а затем произведено сравнение результатов моделирования [3] с результатами анализа цитраферных

съёмки развития нейронов в фазовом и анодальном контрасте, а также при различных флуоресцентных методах (супра)витального окрашивания [4,5].

Моделирование велось в предположении, что исходный нейробласт (без отростков) может рассматриваться как точечный источник заряда, линии поля которого в ходе развития в дальнейшем управляют аксональным наведением и векторами процессов развития отростков (*sensu lato*) и развития филоподий. Были рассчитаны и визуализированы 2D векторные поля (т.е. эквипотенциальные линии, изолинии напряженности и линии тока) в выборках цитраферных записей для нейробластов и одиночных нейронов, а также нейронных ансамблей с разным числом клеток в них. Исходно силовые линии рассчитывались в предположении одинакового заряда всех клеток, но в дальнейшем была создана ещё одна модель для количественного анализа электрического поля популяций нейронов с различным зарядом.

Сопоставление визуализации вычисленных электрических полей нейронов в модели и результатов измерения векторных полей их движения для случая гальванотаксиса было весьма удовлетворительным, что является предсказуемым, исходя из модели [3]. Также обнаружен факт удовлетворительного соответствия модели и эксперимента в случае нейроморфогенеза на полимерных сегнетоэлектрических подложках.

Литература:

1. Gradov O.V., Notchenko A.V., Oganessian V.A. Optics. 2015. V. 4, P. 37–42.
2. Gradov O.V., Adamovich E.D. J. Biomed. Tech. 2017. № 1. P. 25–29.
3. Нотченко А.В., Градов О.В., Бережная Л.А. ФЖ. 2012. Т. 20, № 1–2. С. 9–29.
4. Gradov O.V., Jablovkov A.G. Cellular Ther. Transpl. 2017. V. 6, № 3, P. 41–42.
5. Gradov O.V. Neurogoniometry and related methods for cell bioanisotropy estimations: early stages of neurogoniometry instrumentation development and vector / tensor neuronal symmetry measurements (2011–2015). Dusseldorf: Scholars' Press, 2019. 150 p.

ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Д.А. Грехнёв¹, А.А. Ошколова¹, А.В. Крисанова¹, А.А. Кручинина¹, Ю.В. Новикова¹, Л.Д. Беликова^{2,3}, С.А. Ключников⁴, О.С. Лебедева^{2,5}, Е.В. Казначеева¹ В.А. Вигонт¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФНКЦ физико-химической медицины, Москва, Россия

³ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Научный центр неврологии, Москва, Россия

⁵ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва, Россия

e-mail: dima.greghnyov@yandex.ru

Ключевые слова: пациент-специфичные модели, нейродегенеративные заболевания, болезнь Паркинсона, кальциевая сигнализация, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Болезнь Паркинсона (БП) — одно из самых распространённых нейродегенеративных расстройств с большим разнообразием как наследственных, так и спорадических форм. Большая гетерогенность патологии значительно затрудняет создание платформ для моделирования заболевания и скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Разработка технологичной клеточного репрограммирования и направленной дифференцировки плюрипотентных клеток в различные типы нейронов или глии дали начало новым — пациент-специфичным моделям заболевания. Данные клеточные модели позволяют наиболее адекватно воспроизводить патологический фенотип, присущий конкретному больному с исследуемой патологией, а также исследовать генетически обусловленные спорадические случаи заболевания. В нашей лаборатории мы работаем с целой палитрой пациент-специфичных моделей БП, включая наследственные формы БП с мутациями в генах *LRRK2*, *SNCA*, *PARK2* и генетически обусловленными спорадическими случаями заболевания. Все проведенные нами исследования были выполнены на дофаминергических нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с БП и здоровых доноров. Полученные клеточные модели полностью охарактеризованы. Подтверждена электровозбудимость и экспрессия специфичных нейрональных маркеров, более 90% полученных нейронов экспрессировали маркер дофаминергических нейронов — тирозингидроксилазу. Основной фокус наших исследований обращен на изучение кальциевой сигнализации, нарушения которой неоднократно отмечались в различных моделях нейродегенеративных патологий, включая БП. С помощью метода петч-кламп в конфигурации регистрации интегральных токов через всю плазматическую мембрану клетки мы показали увеличение входа кальция в клетку через потенциал-управляемые каналы в дофаминергических нейронах пациента с мутацией *SNCA* (в сравнении с дофаминергическими нейронами здоровых доноров), и отсутствие выраженных нарушений притока кальция через потенциал-управляемые каналы в дофаминергических нейронах пациентов с мутациями в генах *LRRK2* и *PARK2*. Кроме того, мы отметили выраженное увеличение депо-управляемого входа кальция в дофаминергических нейронах пациентов с мутацией в *LRRK2*, но не в *SNCA* и *PARK2*. Полученные результаты были также подтверждены на изогенной системе с коррекцией мутации в гене *LRRK2*. Таким образом, в зависимости от типа мутации паттерн нарушения кальциевой сигнализации в разных пациент-специфичных моделях может быть различен, что необходимо учитывать при переходе к персонализированной терапии и для повышения эффективности скрининга потенциальных лекарств. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) (договор 415/21-23-НИР) и гранта РФФИ № 22-14-00218.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И AI-АНАЛИЗ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ВЕРИФИКАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ГИСТОСТРУКТУРЫ ПЕЧЕНИ

А.В. Гречина², И.О. Козлов²,
А.А. Венедиктов², Г.А. Пьявченко²,
М.Ю. Шагидулин^{1,2}, Н.А. Онищенко¹,
М.Е. Крашенинников⁴, А.О. Никольская¹,
Е.А. Волкова¹, Н.П. Можейко¹, А.В. Ляндуп⁴,
Л.И. Давыдова³, А.Ю. Архипова^{5,6},
В.Г. Богуш³, С.В. Готьё^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦ трансплантологии и искусственных
органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава
России, Москва, Россия

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

³ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы
народов, Москва, Россия

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

⁶ МГУ-ППИ, Шэньчжэнь, КНР

e-mail: anastasia.grechina@gmail.com

Ключевые слова: визуализация, машинное обучение, реге-
нерация гепатоцитов, печеночная недостаточность

Верификация регенерации повреждённых клеток пе-
чени при лечении хронической печеночной недостаточ-
ности (ХПН) является актуальной проблемой регенера-
тивной медицины. Не ослабевает интерес к поиску новых
эффективных методов, характеризующих регенерацию
повреждённой печени.

Целью исследования стало определение наиболее
информативных морфофункциональных показателей,
пригодных для оценки эффективности коррекции и лече-
ния ХПН с помощью клеточно-инженерных конструкций
(КИК).

Работа выполнена на 80 самцах крыс Вистар
(220–250 г.). Моделирование ХПН осуществляли пу-
тем инъекции 60% ССI₄ под кожу в течение 42 суток.
Мезенхимальные стволовые клетки культивировали
7 суток, затем 3 суток совместно с клетками печени
(КП), которые затем использовали для создания КИК.
Эффективность применения КИК при ХПН оценивали
по морфологии печени и КИК в последующие 90 су-
ток. Преобразование изображений гистологических
срезов проводили в программе MATLAB с использова-
нием алгоритма кластеризации k-средних. Определяли
специфические маркеры для автоматизированного
анализа.

В структуре КИК на 90 сутки выявлены новообра-
зованные сосуды и жизнеспособные гепатоциты, пол-
ная интеграция в ткань печени. В паренхиме печени
выявлена пролиферация гепатоцитов, восстановление
структуры печеночной дольки. Дистрофия структур пе-
чени, жировые вакуоли, степень развития соединитель-
ной ткани были менее выражены в отличие от контроля.
Визуализация морфологических данных с помощью ме-
тодов машинного обучения позволила наглядно предста-
вить эти изменения.

Таким образом, использованные морфофункцио-
нальные показатели состояния печени информативны,
характеризуют эффективность коррекции и лечения
ХПН и могут быть использованы для оценки структурной
динамики в эксперименте.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ПОИСКА И ТЕСТИРОВАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ С НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

И.А. Гривенников, Д.М. Шимченко,
Е.В. Новосадова, С.А. Антонов, Л.А. Андреева,
Н.Ф. Мясоедов, В.З. Тарантул

Институт молекулярной генетики НИЦ Курчатовский
институт, Москва, Россия

e-mail: igorag@img.ras.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные
стволовые клетки человека, дифференцировка, нейро-
трофические факторы, дофаминергические нейроны,
окислительный стресс, эндоканнабиноиды, регуляторные
пептиды.

Открытие возможности репрограммирования сома-
тических клеток и разработка технологии получения ин-
дуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток
человека, открыла новые перспективы в трансплантоло-
гии и изучении молекулярных и клеточных основ тяжелых
болезней человека [1]. Способность ИПС клеток к диф-
ференцировке в разнообразные клетки органов и тканей
человеческого организма, такие как кардиомиоциты, ней-
роны, гепатоциты и т.д., создала новые возможности для
моделирования ряда тяжелых патологий человека, иссле-
дования молекулярных и клеточных механизмов их разви-
тия *in vitro*. Кроме того, технология ИПС клеток позволила
создавать тест-системы, с помощью которых в настоя-
щее время можно проводить масштабный скрининг и вы-
являть свойства потенциальных лекарственных средств,
направленных на лечение конкретных заболеваний, учи-
тывая при этом индивидуальные особенности пациента.
Тот факт, что данная технология позволяет получать ИПС
клетки из индивидуальных дифференцированных сомати-
ческих клеток как от здоровых, так и от больных доноров
создает ей существенные преимущества перед технологи-
ей эмбриональных стволовых клеток, что, в свою очередь,
открывает большие перспективы в развитии персонали-
зированной медицины. В настоящей работе с помощью
созданной многоуровневой тест-системы, основанной
на ИПС клетках человека, полученных от здоровых доно-
ров и пациентов с болезнью Паркинсона, проведен скри-
нинг соединений на наличие нейропротекторной активнос-
ти [2]. На первых этапах, тестирование ряда соединений
пептидной и не пептидной природы осуществлялось как
на недифференцированных ИПС клетках, так и на клет-
ках, находящихся на начальных стадиях дифференциров-
ки (эмбрионидные тела). Такой подход позволял выявлять
наличие или отсутствие у них цито- и эмбриотоксических
свойств. На следующих этапах, с использованием культур
нейрональных предшественников и терминально диф-
ференцированных нейронов было продемонстрировано
нейропротекторное действие ряда пептидов семейства
меланокортинов, а также представителей семейства кан-
набиноидов, таких как N-докозагексаноилдофамин and
N-арахидоноилдофамин [3]. Принципиально важным яв-
ляется тот факт, что использование ИПС клеток и их диф-
ференцированных производных позволяет существен-
ным образом сократить эксперименты по тестированию
перспективных для фармакологии соединений на клетках
животных, а осуществлять их сразу на клетках человека.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского
научного фонда (№ 21-15-00103).

Литература:

1. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
2. Новосадова Е.В., Андреева Л.А., Арсеньева Е.Л. и др. Пат. РФ № 2646446 от 05 марта 2018г.
3. Novosadova E., Antonov S., Arsenyeva E. et al. Neurotoxicology. 2021. V. 82. P. 108–118.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРИОГЕННО-СТРУКТУРИРОВАННОГО ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, В.А. Сургученко, Н.П. Шмерко¹, В.К. Кулакова², Р.В. Иванов², В.И. Лозинский², А.М. Суббот³, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

³ ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия

e-mail: Bear-38@yandex.ru

Ключевые слова: криогенно-структурированный гидрогель, желатин, макропористая губка, тканевая инженерия, печень.

Согласно прогнозам на ближайшие годы, острый дефицит донорских органов будет расти, что делает необходимым поиск альтернативных технологий, в том числе, технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины, основанных на имплантации клеточно-инженерных конструкций (КИК), включающих матрицы-носители, нагруженные стволовыми и/или специализированными клетками [1]. При создании КИК предпочтительными формами матриц являются макропористые системы из твердотельных полимеров или гидрогелей [2].

Целью работы было исследование биологических свойств матрицы из криогенно-структурированного гидрогеля в форме макропористой желатиновой губки, а также возможности создания на ее основе КИК, с различными клеточными компонентами.

Основными компонентами синтеза криогенно-структурированного гидрогеля были желатин (тип А), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид, (ЭДК) и мочевины (все — Sigma-Aldrich, США). Морфологию поверхности исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Степень набухания в воде образцов определяли гравиметрически. Цитотоксичность оценивали на фибробластах мыши линии NIH 3T3 и мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани человека (МСКЖТч) с использованием IncuCyteZOOM (EssenBioscience, США). В качестве клеточной компоненты КИК были выбраны МСКЖТч, клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 или эндотелиальные клетки пупочной вены человека линии EA.hy926. Содержание альбумина в культуральной среде определяли методом иммуноферментного анализа. Скорость метаболизма аммиака оценивали после 90 минут инкубации с 1 mM хлоридом аммония (Sigma-Aldrich, США), разведенным в культуральной среде на 15 сутки эксперимента.

Получение криоструктурированного гидрогеля в форме макропористой губки включало замораживание водного раствора смеси желатина и мочевины, удаление поликристаллов растворителя лиофилизацией,

экстракцию мочевины этанолом и обработку криоструктурата этанольным раствором ЭДК. СЭМ позволила выделить три типа пор на поверхности носителя: крупные (109 ± 17 мкм), средние (39 ± 10 мкм) и малые (16 ± 6 мкм). Степень набухания в воде образцов матрицы составила $3,8 \pm 0,2$ г H₂O на 1 г сухого полимера. Установлена способность макропористой желатиновой губки в составе КИК поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч, клеток линии EA.hy926 и HepG2 в течение 28, 15 и 9 суток, соответственно. Доказано наличие секреции альбумина и метаболизма аммиака при культивировании клеток HepG2 на желатиновой губке.

Таким образом, на примере КИК печени показана перспективность использования матрицы из макропористого криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина для технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Литература:

1. Трансплантология и искусственные органы: учебник / под ред. акад. РАН СВГотье. М.: Лаборатория знаний; 2018. — 319 с.: ил. ISBN 978-5-00101-107-1.
2. Zhao P, Wang J, Li Y, Wang X, Chen C, Liu G. Microfluidic Technology for the Production of Well-Ordered Porous Polymer Scaffolds. Polymers (Basel). 2020;12(9):1863. doi: 10.3390/polym12091863. PMID: 32825098; PMCID: PMC7564514.

ПОРИСТЫЕ МАТРИКСЫ С БИОМИМЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ И СВОЙСТВАМИ

Т.Е. Григорьев¹, Ю.Д. Загоскин¹, К.И. Луканина¹, Т.К. Токаев², М.В. Синицын², Е.А. Храмова⁴, В.И. Севастьянов³, С.Н. Чвалун¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² НМИЦ ФПИ Минздрава России, Москва, Россия

³ НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

e-mail: timgrigo@yandex.ru

Ключевые слова: пористость, трехмерная структура, модуль упругости, биоразлагаемые материалы, биосовместимость

Создание трехмерных биосовместимых носителей — матриц, обладающих заданной морфологией и регулируемые функциональными физико-химическими свойствами, является актуальной задачей науки о полимерах. Многопараметрическое управление характеристиками таких матриц, разработка фундаментальных методик их получения определяют перспективу дальнейшего развития регенеративной медицины. Наряду с биосовместимостью и пористой структурой матрикс должен обладать также биоадекватными физико-механическими характеристиками: как микромеханические характеристики оказывают влияние на процессы адгезии и дифференцировки клеток, так и прочностные характеристики материала влияют на биосовместимость и общую функциональность матрикса.

В докладе отражены основные подходы к созданию пористых материалов с настраиваемой структурой и свойствами: волокнистых нетканых, губчатых и гидрогелевых. Систематически исследована структура и биомеханическое поведение ряда тканей и органов, нативных и децеллюляризованных: кожи, трахеи, диафрагмы, аорты, желчного протока, легких, сердца, почек.

Показано влияние процессов децеллюляризации и релаксации на стабильность к циклическим нагрузкам: при удалении клеточных компонент ткань теряет способность претерпевать многократные циклические деформации без потери прочности. Проведено сравнение биомеханического поведения синтетических и нативных матриц. С применением различных моделей высокоэластичности показано влияние структурных элементов матрикса на его физико-механическое поведение. Показана эффективность использования хитозана и хитина для модификации свойств коллагеновых губчатых материалов. Также систематически исследовано структурообразование принципиально новых высокопористых композиционных материалов — губчато-волокнистых на основе природных полимеров и нетканых волокон, полученных электроформованием. Работа поддержана НИЦ «Курчатовский институт» в области разработки губчатых и гидрогелевых матриц, НМИЦ ФПИ в области *in vivo* тестирования биологических свойств губчатых полилактидных материалов, грантом РФФ № 21-13-00321 в области получения и исследования губчато-волокнистых матриц.

МЕХАНИЗМЫ ПОДАВЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОФИБРОБЛАСТОВ С ПОМОЩЬЮ ИНДУКЦИИ АДИПОГЕНЕЗА: УПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЕМ ФИБРОЗА

О.А. Григорьева², Н.А. Басалова^{1,2}, М.А. Виговский^{1,2}, У.Д. Дьячкова¹, А.Ю. Ефименко^{1,2}

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

² Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: go.grigorievalga@gmail.com

Ключевые слова: фиброз, дифференцировка, миофибробласты, транскриптом единичных клеток.

Процессы дифференцировки стволовых и прогениторных клеток, а также трансдифференцировки терминально дифференцированных клеток лежат в основе механизмов обновления и регенерации ткани, поддержания гомеостаза. Нарушение регуляции этих процессов может приводить к накоплению клеточных типов, патологически изменяющих функционирование тканей. Управление процессом дифференцировки и трансдифференцировки, в частности, позволяет предотвратить, а в будущем и обратить накопление в ткани миофибробластов — основных эффекторных клеток при развитии фиброза. Один из исследуемых способов изменения дифференцировочной программы миофибробластов — стимуляция сигнального пути PPAR γ с помощью индукторов адипогенной дифференцировки.

Анализируя транскриптом единичных мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека, мы обнаружили гены, экспрессия которых разнонаправленно изменяется при стимуляции дифференцировки миофибробластов либо при индукции адипогенной дифференцировки. Полученные данные были валидированы с помощью анализа уровня экспрессии представленных генов с помощью ПЦР в реальном времени. Далее мы разработали *in vitro* модель TGF β -индуцированной дифференцировки легочных фибробластов человека в миофибробласты. В данной модели добавление индукторов адипогенеза приводило

к снижению уровня альфа-гладкомышечного актина (α SMA), количества стресс-фибрилл в клетках, кроме того, снижалась способность клеток сжимать коллагеновый гель, характерная для миофибробластов. При этом в клетках значительно рос уровень экспрессии генов, характерных для адипогенеза — PPAR γ и FABP4.

ПЦР-анализ образцов, полученных в разработанной модели, показал, что гены, выявленные в результате предварительного биоинформатического анализа образцов МСК человека (FN1 (фибронектин-1), CHD3 (хеликазный хромодомен ДНК-связывающего белка 3), NTM (нейротримин), VCAN (версикан), RHD10 (ретинолдегидрогеназа-10)), также разнонаправленно экспрессируются и в фибробластах легких человека. Уровень экспрессии этих генов рос в модели TGF β -индуцированной дифференцировки в миофибробласты и снижался в клетках после воздействия адипогенных индукторов.

Полученные данные позволяют лучше понять механизмы трансдифференцировки миофибробластов и выявить новые перспективные мишени для лекарственной терапии фиброза.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 21-315-70002.

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Т.М. Гринчук, М.А. Шорохова, Н.Н. Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: grintat@bk.ru

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, кариотип, хромосомные aberrации

Необходимым условием использования стволовых клеток (СК) в регенеративной медицине является генетическая безопасность клеточного материала. Важным тестом, позволяющим оценить генетическую безопасность на уровне клетки и на уровне популяции, является детальный цитогенетический анализ, основанный на изучении морфологии хромосом в пределах кариотипического набора. На сегодняшний день наиболее исследованы и востребованы в медицинской практике мезенхимные клетки (МСК) костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови. Установлено, что разнотипные МСК в системе *in vitro* в ряде случаев характеризуются утратой генетической стабильности. На уровне кариотипа это выражается в появлении анеуплоидных клеточных вариантов, межхромосомных ассоциаций, способствующих изменению структуры кариотипического набора и разнотипных хромосомных перестроек, в том числе транслокаций, инверсий, кольцевых хромосом, приводящих к изменению положения генов с возможной активацией про- и онкогенов.

Анализ физиологических и генетических особенностей ряда линий эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эмСК), полученных в лаборатории внутриклеточной сигнализации и транспорта ИИЦ РАН, показал, что по ряду характеристик, а именно, доступности донорского материала, неинвазивному выделению, наличию высокого пролиферативного потенциала, низкой иммуногенности, способности секретировать большое количество факторов, играющих ключевую роль в восстановлении и регенерации тканей, они превосходят МСК из других источников.

Цитогенетический анализ G-бандированных метафазных хромосом клеток выявил мономорфность возможных кариотипических aberrаций — возникновение поломок хромосомного материала разной локализации, не стимулирующих клетки к онкогенезу. Проведенный нами молекулярный анализ подтвердил случайный (неклональный) характер выявляемых хромосомных поломок.

В свете полученных данных, на данном этапе использования СК в целях регенеративной медицины, ЭМСК предлагается рассматривать как наиболее генетически безопасные, а, следовательно, более перспективные клеточные линии. Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 22-74-10126.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ФЕРМЕНТОВ ОСНОВНОГО ПУТИ СИНТЕЗА ЦЕРАМИДОВ DE NOVO В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СЕРДЦА И СОСУДОВ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

О.В. Груздева, Ю.А. Дылева, Е.В. Белик, А.В. Понасенко, А.О. Поддубняк, А.Г. Кутихин, В.Е. Маркова, С.В. Иванов, О.Л. Барбараш

ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

e-mail: o_gruzdeva@mail.ru

Ключевые слова: церамиды, ферменты синтеза *de novo*, сердечно-сосудистые заболевания

Церамиды, являясь биологически активными липидами и основными составляющими сигнальных путей сфинголипидов в клетках, участвуют во многих фундаментальных клеточных процессах и способны индуцировать воспаление и апоптоз. Церамиды и изменения в их соотношении, согласно данным клинических исследований, рассматриваются в качестве новых предикторов риска сердечно-сосудистых заболеваний независимо от традиционных факторов риска. Однако в основном область научного интереса в исследованиях касается изучения уровня церамидов в плазме крови, в то время как необходимо понимать, как синтезируются и в каком соотношении эти биологические молекулы в непосредственной близости от сердечной мышцы.

Цель: оценить уровень экспрессии ферментов основного пути синтеза церамидов в жировой ткани пациентов различной локализации у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Материалы и методы. В исследование включено 20 пациентов с ИБС и показаниями к прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования (КШ). Группу сравнения составили 18 пациентов с коронарогенными патологиями сердца (приобретенные ревматические пороки сердца — митральный и аортальный стеноз / недостаточность). Во время проведения оперативного вмешательства были получены биоптаты подкожной, эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани. Для измерения экспрессии генов ферментов синтеза церамидов пути *de novo* (*SPTLC1* — ген серинпальмитойлтрансферазы субъединица C1, *SPTLC2* — ген серинпальмитойлтрансферазы субъединица C2, *CERS6* — ген церамидсинтазы 6, *DEGS1* — ген дигидроцерамиддесатуразы субъединица 1) использовался метод количественной ПЦР с праймерами, синтезированными ЗАО «Евроген» (г. Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Нормирование результатов

ПЦР проводилась с помощью референсных генов *ACB*, *GAPDH*, *B2M*. Анализ уровня ферментов синтеза церамидов пути *de novo* в ЖТ пациентов был проведен методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг) с использованием поликлональных антител кролика (*SPTLC1* Antibody, CSB-PA022639ESR1HU-100, *SPTLC2* Antibody, CSB-PA022640LAO1HU-100, *CERS6* Antibody, CSB-PA751145LAO1HU-100, *DEGS1* Antibody, CSB-PA617990-100, Cusabio, Китай) и антител козла к бета-тубулину (контроль загрузки, ab21057, 1:1000, Abcam). Статистический анализ полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Результаты. Результаты экспрессии генов интереса среди пациентов с ИБС демонстрируют более высокую экспрессию гена ключевого фермента пути *de novo* *SPTLC1* и фермента завершающей стадии синтеза церамидов *DEGS1* в образцах ПЖТ ($p=0,0002$ и $p=0,023$ соответственно) и ЭЖТ ($p=0,015$ и $p=0,031$ соответственно) в сравнении с ПВЖТ. Уровень генной экспрессии *SPTLC2* был выше только в образцах ЭЖТ в сравнении с ПВЖТ ($p=0,013$). Экспрессия *CERS6* была максимальной в ЭЖТ в сравнении с ПЖТ ($p=0,010$) и ПВЖТ ($p=0,003$). В группе пороков сердца образцы ЖТ не отличались по уровню экспрессии *SPTLC1*, *SPTLC2* и *CERS6*, в то время как генная экспрессия *DEGS1* в образцах ЭЖТ была выше чем в ПЖТ ($p=0,014$). При этом пациенты с ИБС отличались более высокой экспрессией *SPTLC1* в ПЖТ ($P=0,00003$), ЭЖТ ($P=0,0022$) и *SPTLC2* в образцах ЭЖТ ($P=0,039$). Генная экспрессия *CERS6* не имела межгрупповых различий. *DEGS1* был более экспрессирован в ПЖТ ($p=0,029$) и ЭЖТ ($p=0,035$) пациентов с ИБС, чем в группе сравнения.

Заключение. Таким образом, коронарогенная патология сердца сопровождается активацией синтеза церамидов по пути *de novo* и усиленной экспрессией ключевых ферментов этого пути (серинпальмитойлтрансферазы субъединица C1 и C2, церамидсинтазы 6, дигидроцерамиддесатуразы субъединица 1) в отличие от пациентов с приобретенными пороками клапанов сердца. Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 22-15-20007 «Церамидный профиль локальных жировых депо сердца: клинико-патогенетическое значение и терапевтический потенциал».

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК КАРДИОСФЕР С ПОМОЩЬЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ СЕКРЕЦИИ ПРОАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

А.А. Гусева, К.В. Дергилев, Е.С. Зубкова, А.В. Андреев, М.Ю. Меньшиков, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Ю.Д. Гольцева, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: кардиосферы, ангиогенез, липополисахариды.

Клетки кардиосфер рассматриваются в качестве перспективного инструмента клеточной терапии заболеваний сердца, обладающего высоким терапевтическим потенциалом за счет секреции биологически активных соединений, микровезикул/экзосом. В настоящее время ведется активный поиск подходов, направленных на модуляцию секреторного клеточного кардиосфер с целью его

спецификации для определенных патологий и повышения репаративных свойств.

Цель исследования: исследовать содержание проангиогенных факторов в среде культивирования клеток кардиосфер после стимуляции липополисахаридами (ЛПС).

Для получения кардиальных сфероидов (кардиосфер) использованы образцы ушка правого предсердия, полученных от пациентов с ИБС в ходе операции аортокоронарного шунтирования. Кардиосферообразующие клетки получали методом эксплантной культуры, сборку сфероидов проводили на чашках с низкоадгезионным покрытием (poly-HEMA). Характеристику клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени. Стимуляцию клеток сфероидов проводили с помощью ЛПС (100 нг/мл) в течение 24 часов. Анализ секрета выполняли с помощью мультиплексного иммуноанализа Magpix.

Показано, что на поверхности клеток кардиосфер присутствуют белки характерные для кардиальных прогениторных клеток (CD105, CD73, CD117, Sca-1 like) и отсутствуют маркеры гематопоэтических клеток. Обнаружено, что клетки кардиосфер экспрессируют Толл-подобные рецепторы 4 типа (TLR4), которые способны распознавать ЛПС. В кондиционированной среде клеток кардиосфер после стимуляции ЛПС наблюдалось увеличение содержания проангиогенных факторов: VEGF (63+/-2,8 vs 243+/-18,5 пг/мл), Rantes (59,9+/-2,7 vs 2981+/-1641 пг/мл), MCP1 (56,9+/-2,7 vs 4739,8+/-2885,4 пг/мл), IL8 (55+/-2,8 vs 6879,5+/-29,8 пг/мл), Fraktalcine (30+/-2,8 vs 72,2+/-8,8 пг/мл).

Таким образом, ЛПС могут выступать в качестве индуктора секреции VEGF и других проангиогенных факторов клетками кардиосфер. Прекондиционирование клеток кардиосфер с помощью ЛПС может служить основой для создания подходов для разработки препаратов направленного действия (на основе компонентов секрета) для лечения заболеваний ишемической природы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 19-15-00384 «Исследование механизмов активации эпикарда при повреждении сердца и возможности стимулировать репаративный ангиогенез и репарацию миокарда после ишемического повреждения путем активирующих воздействий на эпикард»

IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ БИОАКТИВНЫХ ФИБРИЛЛЯРНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ АМФИФИЛОВ

К. Даиоб, М. Зухайб, Т.И. Абдуллин, Д. Салахиева, Р.И. Гарифуллин

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: kenanadayob@gmail.com

Ключевые слова: биоматериалы, пептидные амфифилы, нанофибриллы, клеточные матриксы

Пептидные амфифилы (ПА) представляют собой многофункциональные молекулы, способные собираться в супрамолекулярные матриксы и проявлять различные биохимические и физико-химические свойства. Благодаря своим свойствам и биосовместимой природе ПА являются перспективной основой для создания новых биоматериалов для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

В нашей работе исследован потенциал ПА с последовательностью WAGHH, модифицированной насыщенной жирной кислотой с различной длиной углеродной цепи. Оптимизированы условия формирования матриксов на поверхности культуральной посуды в зависимости от концентрации, pH, температуры. По данным сканирующей электронной микроскопии матриксы имели организованную фибриллярную структуру с диаметром фибрилл в нанометровом диапазоне. Показана возможность включения в нанофибриллярный матрикс ионов переходных металлов (Cu, Zn, Mn), способных генерировать АФК в фентоновских реакциях.

По данным теста на жизнеспособность клеток и оптической микроскопии нанофибриллярный матрикс оказывал различное модулирующее влияние на пролиферацию фибробластов и нейрональных клеток. Включенные металлы в зависимости от концентрации проявляли дополнительное модулирующее влияние на поведение клеток. Результаты представляют интерес для дальнейшего создания биоактивных пептидных биоматериалов с нанофибриллярной структурой, способных связывать ионы металлов, поддерживать рост клеток млекопитающих и модулировать их активность. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

РАЗРАБОТКА ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ТАМПОНИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ И АЛЬГИНАТНЫХ ГЕЛЕЙ

Д.М. Дарвиш^{1,3}, И.О. Гаврилюк², А.Н. Куликов², В.В. Васильева³, Е.С. Цобкалло³, Н.А. Михайлова¹

¹ *Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: darvishdi@mail.ru

Ключевые слова: ожоги глаз, коллаген I типа, коллагеновый гель, альгинатный гель, инъекционные формы гелей

Ожоги глаз как химические, так и термические могут приводить к серьезному поражению тканей глаза и повлечь за собой потерю зрения. Одним из факторов, влияющих на степень тяжести поражения, является своевременность оказания первой помощи пострадавшему. При ожогах происходит дезэпителизация поверхностных тканей глаза, что может в короткие сроки приводить к их склеиванию, выражающемуся в укорочении или полном исчезновении конъюнктивальных сводов. Особенно остро эта проблема может стоять в военно-полевых условиях, когда пострадавший не может быть быстро доставлен в специализированный стационар. Нами была предложена модель офтальмологического тампонирующего средства для оказания первой помощи в таких условиях. Модель предполагает герметизацию конъюнктивальной полости и заполнение ее препаратом способным хорошо распределяться и удерживаться в ней не менее 24 часов. В качестве такого средства было предложено использовать инъекционные формы коллагеновых и альгинатных гелей.

В результате экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, было показано, что основной проблемой при использовании коллагеновых гелей является существенное

уменьшение их поперечных размеров вследствие вытеснения влаги из структуры геля. В ходе работы была проведена модификация таких гелей гиалуроновой кислотой, альгинатом натрия и ПЭГ-400. Наилучший влагоудерживающий эффект наблюдался после обработки коллагеновых гелей раствором альгината натрия, однако только гиалуроновая кислота могла быть введена в структуру геля до его желирования и не препятствовала процессам фибриллообразования.

Инъекционная форма альгинатного геля была получена путем смешивания раствора альгината натрия с раствором CaSO_4 в глицерине. Такие гели имели удовлетворительное время желирования, не теряли влагу при сжатии и в течение длительного времени сохраняли тампонирующее действие.

Контрольные эксперименты *in vivo* на модели обожженного глаза показали существенное превосходство коллагеновых гелей в качестве тампонирующего офтальмологического средства. Несмотря на более слабые механические свойства, коллагеновые гели способствовали сохранению тканей глаза, а также имели выраженное противовоспалительное действие.

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ ПУБЛИКАЦИЙ О НОВЫХ МЕТОДАХ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Э.Т. Дегирменджи, С.С. Хилько

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского», ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

e-mail: evelinadegirmenji@yandex.ru

Ключевые слова: инфаркт миокарда, метод AAV9, CircTRRAP, действие CDR132L

Введение. В основе последствий инфаркта миокарда (ИМ) лежит критическая потеря сократимости миокарда вследствие замены его поврежденного участка фибробластами. В настоящее время попытки восстановления поврежденных тканей предпринимаются учеными с использованием генной терапии.

Цель исследования. Провести анализ литературных данных, посвященных изучению новым методом генной терапии для лечения последствий ИМ.

Методы. Для достижения поставленной цели проведен систематический поиск и анализ результатов публикаций и онлайн ресурсов за период с 2020 по 2022 год. Все публикации были индексированы из баз PubMed, e-Library, Scholar.

Результаты. Ученые исследовали [2], что CircTRRAP экспрессируется в огромном количестве после гипоксии в кардиомиоцитах. Его подавление способствует росту клеток и ингибирует апоптоз, воспаление, окислительный стресс в клетках.

По данным исследователей из Китая [3] сверхэкспрессия гена *Ndufs1* с помощью метода AAV9, облегчает сердечную дисфункцию и миокардиальный фиброз в фазе заживления инфаркта миокарда. Это лечение может существенно улучшить качество жизни пациентов.

Также определили [4], что сверхэкспрессия гена *Shhg1* способствует пролиферации кардиомиоцитов, ангиогенезу и ингибирует апоптоз клеток после ИМ. *Shhg1* способен образовать петлю положительной обратной связи с c-Myc, что позволяет поддерживать активацию передачи сигналов PI3K/Akt.

Исследователи провели первое клиническое испытание [5], которое продемонстрировало ингибирующее действие CDR132L на *mir-132*. Результаты показали дозозависимое, статистически значимое снижение *mir-132* в плазме. Испытание антисмыслового препарата обнадеживает, т.к. у пациентов с сердечной недостаточностью состояние улучшилось.

Проведенный анализ литературы подтверждает необходимость в дальнейших исследованиях по изучению действия генов в устранении последствий ИМ.

Выводы. Выявлена возможность геннотерапевтической коррекции постинфарктных изменений миокарда. Для оценки клинической и экономической эффективности генной терапии для лечения последствий инфаркта миокарда необходимо проведение экспериментальных и рандомизированных многоцентровых исследований.

Литература:

1. Yuan Zhang et al. *Cardiovasc Ther* (2022).
2. Qi B., Song, L., Hu, L. et al. *Exp Mol Med* (2022).
3. Mengsha Li et al. *Theranostics* (2021).
4. Yorg Taubel, Wilfried Hauke et al. *European Heart Journal* (2021).

ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ МСК В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ

А.В. Дегтярева¹, В.В. Зубков¹, М.Х. Исаева¹, Е.А. Филиппова¹, М.Б. Албегова¹, А.А. Буров¹, И.В. Дубровина¹, К.В. Горюнов¹, Ю.А. Шевцова¹, Д.Н. Силачев¹, Г.Т. Сухих¹

¹ *НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия*

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

e-mail: a_degtyareva@oparina4.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, Криглер-Найяр, билиарная атрезия, печеночный холангит, гепатопротекция.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются альтернативным методом для лечения метаболических нарушений печени. В ряде работ было показано, что МСК избирательно накапливаются в печени при внутривенном введении [1], могут дифференцироваться в гепатоциты и участвовать в регенерации при различных патологиях [2].

В рамках терапии синдрома Криглера-Найяра I типа ребенку провели трансплантацию аллогенных МСК, выделенных из пуповины человека. Целью данного лечения являлось уменьшение продолжительности фототерапии при сдерживании уровня билирубина в сыворотке крови.

Фототерапия была начата ребенку в возрасте 5 сут жизни, когда уровень билирубина составил 340 мкмоль/л. Однако уровень билирубина продолжал варьировать от 329 до 407 мкмоль/л. В связи с чем, на 2 месяце жизни было принято решение о трансплантации МСК, на фоне которой отмечалось значительное снижение продолжительности фототерапии до 2 ч в день. В течение всего периода наблюдения, составляющего 2 года, ребенку провели 6 трансплантаций МСК. Отмечено, что эффект сохранялся в течение 2–3 мес. Побочных эффектов от трансплантации при этом выявлено не было.

МСК также показали свою эффективность для терапии последствий операции Касаи. Это процедура удаления поврежденных вследствие билиарной атрезии желчных протоков и создание анастомоза между печенью и двенадцатиперстной кишкой. Однако, операция связана с последствиями, наиболее распространенными из которых является печеночный холангит из-за инвазии микрофлоры кишечника.

У 2х детей с БА после процедуры Касаи развился тяжелый рецидивирующий холангит, который требовал пересадки печени в обоих случаях, в связи с нарастающей печеночной дисфункцией. На фоне терапии МСК в обоих случаях удалось остановить воспалительный процесс и восстановить функциональную активность печени. На данный момент от начала терапии МСК дети находятся под наблюдением на протяжении 3 лет 9 месяцев и 2 лет 6 месяцев. На протяжении всего периода мониторинга у обоих пациентов не обнаружено рецидива холангита, нарушений в функции печени не выявлено, показания к проведению трансплантации печени отсутствуют.

Таким образом, МСК являются эффективным средством терапии для печеночных патологий.

Литература:

1. Gholamrezanezhad A., Mirpour S., Bagheri M. et al. Nucl. Med. Biol. 2011. V. 38. P. 961.
2. Zhang, Z.D., Lin H., Shi M. et al. J. Gastroenterol. Hepatol. 2012. V. 27 (Suppl-2). P. 112.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Е.В. Деметьева, С.В. Павлова, А.Е. Шульгина, К.А. Проняева, С.М. Закиян

ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, клиническое значение мутаций, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, система CRISPR/Cas, кардиомиоцит.

Внедрение методов секвенирования нового поколения в клиническую практику для проведения генетического анализа пациентов с гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) приводит к выявлению все большего числа мутаций в генах, ассоциированных с данным заболеванием. Однако не для всех обнаруженных генетических вариантов в настоящее время установлено их клиническое значение. Заключение о клиническом значении мутаций основывается преимущественно на популяционно-генетических данных и результатах анализа *in silico*. Новые перспективы для оценки клинического значения генетических вариантов открывают методы редактирования нуклеотидных последовательностей, в частности система CRISPR/Cas, которые позволяют вносить и/или исправлять исследуемые мутации. Редактирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их последующая направленная дифференцировка дают возможность получать кардиомиоциты, различающиеся наличием и/или отсутствием только одной мутации, и оценивать ее влияние на развитие заболевания.

В ходе секвенирования клинического экзоза пациентов с ГКМП нами были обнаружены две мутации

с неясным клиническим значением: p.Asn515del в гене *MYBPC3* и p.Met659Ile в гене *MYH7*. Кардиомиоциты, полученные при направленной дифференцировке ИПСК пациентов с данными мутациями, демонстрировали увеличенный размер, нарушения в осцилляции ионов кальция и повышение уровня экспрессии регуляторных генов кардиомиоцитов и генов саркомерных белков. Тем не менее остается неясным, являются ли обнаруженные признаки ГКМП следствием влияния мутаций p.Asn515del в гене *MYBPC3* и p.Met659Ile в гене *MYH7*. Мы применили систему CRISPR/Cas9 для внесения данных мутаций в ИПСК здорового донора. В докладе будут представлены результаты редактирования генов *MYBPC3* и *MYH7* в ИПСК здорового донора, характеристика линий ИПСК с внесенными мутациями и анализ кардиомиоцитов, полученных в результате дифференцировки ИПСК с внесенной в ген *MYBPC3* мутацией p.Asn515del. Работа поддержана грантом РНФ № 22-15-00271.

БРОНХИАЛЬНЫЕ И ЛЕГОЧНЫЕ ОРГАНОИДЫ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ МУКОВИСЦИДОЗА

А.Г. Демченко¹, Е.В. Кондратьева¹, В.Ю. Табаков¹, Е.Л. Амелина², А.В. Лавров¹, С.А. Смирнихина¹

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

² ФГУ НИИ Пульмонологии ФМБА, Москва, Россия

e-mail: demchenkoann@yandex.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органоиды, муковисцидоз, CFTR

Бронхиальные (БО) и легочные органоиды (ЛО), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ЧИПСК), могут быть применены в персонализированной диагностике и терапии муковисцидоза. Муковисцидоз обусловлен мутациями в гене *CFTR*, и в более чем 50% вызван мутацией F508del. В результате мутаций нарушается транспорт ионов хлора и натрия через канал CFTR в клеточной мембране. Проводимость CFTR-канала *in vitro* оценивают форсколиновым тестом. Целью работы было получить и охарактеризовать бронхиальные и легочные органоиды из ЧИПСК здорового донора и донора с муковисцидозом с гомозиготной мутацией F508del, а также оценить пригодность полученных органоидов, для функционального теста проводимости CFTR-канала.

Дифференцировку ЧИПСК [1, 2] в БО и ЛО проводили по опубликованным протоколам с модификацией некоторых этапов [3, 4]. Характеризацию БО и ЛО на экспрессию маркеров клеток легкого проводили методами иммуноцитохимического окрашивания, проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Функциональный анализ CFTR-канала в органоидах проводили методом форсколин-индуцированным набуханием (ФИС). Изображения анализировали в программном обеспечении iLastic и CellProfiler.

Получены бронхиальные и легочные органоиды из ЧИПСК здорового донора и донора с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR*. БО экспрессируют маркеры базальных, бокаловидных и крупных секреторных клеток. ЛО, помимо вышеперечисленных маркеров, экспрессируют маркеры альвеолоцитов 1 и 2 типов. В обоих типах органоидов, полученных из ЧИПСК здорового донора, подтверждена экспрессия гена *CFTR*. При ФИС, БО и ЛО из ЧИПСК

здорового донора набухали на 24 ч в среднем в 1,48 раз ($p=0,0175$) и 3,29 раз ($p<0,0001$) относительного исходного значения, соответственно. БО и ЛО из ЧИПСК донора с муковисцидозом демонстрировали отсутствие набухания на 24 ч относительного О ч.

Результаты работы демонстрируют клеточный состав бронхиальных и легочных органоидов, а также возможность их применения в качестве модели, для персонализированной оценки проводимости канала CFTR и, в дальнейшем, в качестве модели, для разработки новых методов лечения.

Литература:

1. Kondrateva E, Adilgereeva E, Amelina E et al. Stem Cell Res. 2020. V. 48. P. 101933.
2. Salikhova DI, Leonov GE, Bukharova TB et al. Genes and Cells. 2019. V. 14. P. 46–53.
3. McCauley KB, Hawkins F, Kotton DN Curr Protoc Stem Cell Biol. 2018. V. 45. P. e51.
4. Leibel SL, McVicar RN, Winquist AM et al. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2020. V. 54. P. e118.

УЧАСТИЕ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ БЕЛКА p53 В ОСТРЫЙ И РАННИЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

С.В. Демьяненко, В.В. Гузенко, С.А. Батальщикова

Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

e-mail: demyanenkosvetlana@gmail.com

Ключевые слова: деацетилазы гистонов, p53, апоптоз, фототромботический инсульт

Пост-трансляционное ацетилирование остатков лизина гистоновых и негистоновых белков регулирует важнейшие функции клеток [1]. Гистонацетилтрансферазы (НАТ) переносят ацетильные группы от ацетил-коэнзима А на ϵ -аминогруппу остатков лизина, а гистондеацетилазы (HDAC) катализируют удаление ацетильных групп. На клеточных и животных моделях ишемии было показано, что ингибиторы HDAC (iHDAC) защищают нервные клетки и способствуют восстановлению после инсульта [2]. Однако использование неселективных iHDAC имеет ряд побочных эффектов [2]. Поэтому поиск изоформ НАТ/HDAC, участвующих в пост-трансляционной модификации сигнальных белков и факторов транскрипции необходим для выяснения причин цитотоксичности iHDAC и разработки новых модуляторов НАТ/HDAC для терапии инсульта.

Все исследования проведены на модели фототромботического инсульта (ФТИ). Протеомные исследования позволили определить глобальные регуляторы апоптоза клеток мозга после ФТИ — факторы транскрипции p53, E2F1 и c-Myc, а также изоформы НАТ (НАТ1, PCAF) и HDAC (HDAC1, HDAC2, HDAC6), участвующие в повреждении и репарации после ФТИ [3]. Исследования показали, что наиболее значительные изменения экспрессии p53 наблюдались через 24 часа после ФТИ причем как в ядрах, так и в цитоплазме клеток ишемической пенумбры, а в нейронах уровень белка оставался высоким и через 7 суток после ФТИ. С помощью базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>) и программы GPS-PAIL 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/online.php>) удалось идентифицировать возможные сайты ацетилирования p53.

In vivo было показано, что ФТИ вызывает рост ацетилирования p53 по K373 и K320 через 24 часа после ФТИ, ацетилирование p53 по K320 сохраняется и в период репарации. Эксперименты с активатором p53 WR1065 показали, что ацетилирование p53 по K373 повышает стабильность белка, способствует транслокации p53 в ядра нейронов и росту апоптоза нейронов после ФТИ. Методами Duolink PLA (метод близкого лигирования) и ко-иммунопреципитации было установлено, что p53 непосредственно взаимодействует с ацетилтрансферазой PCAF и деацетилазами HDAC2 и HDAC6. Однако использование ингибиторов HDAC2 (MI192) и HDAC6 (HPOB, тубастатин А) показало, что модуляция активности p53 путем его ацетилирования по K373 не отвечает за нейропротекцию, опосредованную селективными ингибиторами HDAC2 и HDAC6, их противоапоптотическое действие было связано с сохранением уровня ацетилирования p53 по K320.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

Литература:

1. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Krämer OH. Cell Biol. 2009. V. 41(1). P. 185–98.
2. Demyanenko S, Dzreyan V, Sharifulina S. Biomedicines. 2021. V. 9(10). P. 1445.
3. Demyanenko S, Uzdensky A. Mol Neurobiol. 2017. V. 54(9). P. 6839–6856.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ СБОРКИ КАРДИАЛЬНЫХ МЕЗОТЕЛИАЛЬНЫХ СФЕРОИДОВ

К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, А.А. Гусева, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: сфероид, эпикардальное микроокружение.

Фундаментальные исследования последних лет позволили переосмыслить роль эпикарда в молекулярных и клеточных механизмах онтогенеза сердца и его репарации после повреждения. Однако его изучение крайне затруднено в связи с отсутствием релевантных моделей, моделирующих эпикардальную микроокружение.

Цель исследования. Сравнить способы сборки эпикардальных сфероидов (эпироидов) и охарактеризовать их свойства.

В работе использованы клетки эпикардального мезотелия, полученные из эмбрионального сердца мыши методом эксплантной культуры. Для сборки эпироидов протестировано несколько подходов культивирования клеток: 1) на чашках с поли-Д-лизином; 2) методом «висячей капли»; 3) в V-образных чашках с низкоадгезивным покрытием. Характеристику сфероидов проводили с помощью иммуногистохимических и иммунофлуоресцентных методов окрашивания, световой и конфокальной микроскопии и анализа изображений с помощью пакета программ MetaMorph®

Показано, что культивирование клеток эпикардального мезотелия на чашках с поли-Д-лизином и методом «висячей капли» не являются оптимальными подходами для сборки сфероидов. Культивирование в вышеуказанных условиях сопровождалось более длительным периодом формирования первичных клеточных скоплений

(24–72 часа), образованные сфероиды имели неправильную форму, низкий уровень компактизации и характеризовались высокой вариабельностью в размерах (50–320 мкм). При этом часть клеток не принимало участия в сферогенезе. Культивирование суспензии клеток в V-образных чашках с низкоадгезионным покрытием приводило к формированию сфероидов 152+/-23 мкм в течение 48 часов. Гистологические исследования показали, что в составе полученных сфероидов клетки имеют упорядоченную организацию с высоким уровнем компактизации в поверхностном слое и более низким в зоне ядра. Иммунофлуоресцентные окрашивания криосрезов эпироидов показали, что клетки сохраняют экспрессию мезотелиальных маркеров (Wt1, Epicardin), формируют плотные контакты, образованные на основе белка ZO-1, а также низкий уровень экспрессии гладкомышечного альфа-актина, виментина и коллагена 1 типа, что указывает на сохранение эпителиоподобного статуса большинства клеток эпикарда в составе эпироидов. При стимуляции TGFβ1 наблюдалось увеличение уровня компактизации эпироидов и накопление белков внеклеточного матрикса (фибронектина, коллагенов 1 и 3 типа).

Таким образом, культивирования эпикардиальных клеток в V-образных чашках с низкоадгезионным покрытием может рассматриваться в качестве оптимального способа для сборки эпироидов в сравнении с другими исследованными подходами. Клетки в составе эпироидов сохраняют свойства клеток эпикардиального мезотелия и способность отвечать на воздействие профиброзного регулятора TGFβ1, что позволяет рассматривать полученные сфероиды в качестве перспективной модели эпикардиального микроокружения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-29-04164 «Разработка модели эпикардиального сфероида (эпироида) для изучения влияния воспаления и патологических факторов риска сердечной недостаточности на эпикардиальное микроокружение и механизмы репарации сердца»

СФЕРОИДЫ НА ОСНОВЕ ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ КЛЕТОК МЕЗОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА (ЭПИРОИДЫ) — МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ЭПИ-/СУБЭПИКАРДИАЛЬНОГО ФИБРОЗА

К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, А.А. Гусева, И.Б. Белоглазова, А.В. Андреев, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: сфероид, эпикардиальное микроокружение.

Хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса является широко распространенным заболеванием сердца, ассоциированным с прогрессированием кардиального фиброза, и имеющем ограниченные возможности для медикаментозной коррекции. Отсутствие эффективных методов лечения этой патологии в определенной степени связано с отсутствием репрезентативных *in vitro* моделей, которые могут быть использованы для поиска лекарственных мишеней и разработки фармацевтических препаратов направленного действия. Особый интерес в этом отношении представляет клетки эпикардиального мезотелия, которые

способны формировать пул фибробластов сердца и участвовать в развитии/прогрессировании фиброза.

Цель исследования: разработать 3D модель эпикардиального микроокружения (эпироид) и исследовать влияние профиброзного индуктора TGFβ1 на ее свойства.

Эпителиоподобные клетки эпикардиального мезотелия выделяли из образцов, полученных в ходе операции аорто-коронарного шунтирования от пациентов с ишемической болезнью сердца. Для сборки эпироидов использовали метод культивирования в U-образных чашках с низкоадгезионным покрытием. Характеристику сфероидов проводили с помощью ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга, методов иммуногисто/иммунофлуоресцентного окрашивания.

Показано, что сформированные эпироиды образуются путем компактизации клеток, сохраняющих маркеры эпикардиального мезотелия, формирующих ZO-1+ содержажие плотные контакты и имеющих низкий уровень экспрессии маркеров фибробластов и коллагенового матрикса, что соответствует организации зоны эпикарда в неповрежденном сердце. При воздействии рекомбинантного TGFβ1 происходит уменьшение размеров сфероидов, в центральной части которого клетки приобретают веретенообразную форму, усиливают экспрессию генов мезотелиально-мезенхимального перехода, маркеров фибробластов и накапливают белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин), что указывает на признаки фиброзной трансформации.

Разработанная модель (эпироид) на основе клеток эпикарда с определенной долей допущения способна воспроизводить некоторые характеристики нативного эпикардиального микроокружения и модулировать клеточный ответ на воздействие профиброзного индуктора TGFβ1. Эта модель может быть использована для дальнейшего изучения механизмов регуляции эпикардиального микроокружения и его участия в патогенезе развития фиброза сердца.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-29-04164 «Разработка модели эпикардиального сфероида (эпироида) для изучения влияния воспаления и патологических факторов риска сердечной недостаточности на эпикардиальное микроокружение и механизмы репарации сердца».

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК КАРДИОСФЕР С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА 1 ВЫЗЫВАЕТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ СЕКРЕТОМА

К.В. Дергилев, А.А. Гусева, Е.С. Зубкова, А.В. Андреев, М.Ю. Меньшиков, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Ю.Д. Гольцева, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: кардиосферы, воспаление.

В настоящее время большое внимание уделяется регуляторным эффектам клеток кардиосфер, которые определяются действием биологически активных веществ, содержащихся в их секретоме. Направленная модуляция состава секретомы клеток рассматривается как перспективная стратегия для разработки

инновационных лекарственных препаратов для лечения заболеваний сердца.

Цель исследования: исследовать воздействие recombinantного трансформирующего фактора роста бета 1 (TGFb1) на клетки кардиосфер с целью противовоспалительного профилирования их секретом.

Для получения кардиальных сфероидов (кардиосфер) использованы образцы ушка правого предсердия, полученных от пациентов с ИБС в ходе операции аортокоронарного шунтирования. Кардиосферообразующие клетки получали методом эксплантной культуры, сборку сфероидов проводили на чашках с низкоадгезионным покрытием (poly-HEMA). Характеристику клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии, иммуноблоттинга, ПЦР в реальном времени. Стимуляцию клеток сфероидов проводили с помощью TGFb1 (20 нг/мл) в течение 24 часов. Анализ секретом выполняли с помощью мультиплексного иммуноанализа Magpix.

Показано, что добавление в среду культивирования TGFb1 способствовало ускорению сборки и 3-кратному повышению числа сфероидов, имеющих размер 100–150 мкм. Обнаружено, что клетки кардиосфер наряду с классическими маркерами прогениторных клеток сердца, экспрессируют TGFb1, TGFb2, TGFb3 рецепторы. В кондиционированной среде клеток кардиосфер после стимуляции TGFb1 наблюдалось снижение содержания провоспалительных (TNFa (60,9+/-2,8 vs 0,7+/-0,4 пг/мл), IL1a (57,9+/-2,8 vs 7,1+/-2,6 пг/мл), MIP1a (57,9+/-2,8 vs 1,8+/-0,5 пг/мл), MIP1b (58,9+/-2,8 vs 0,7+/-0,1 пг/мл), IL7 (53,9+/-2,8 vs 4,3+/-0,9 пг/мл), IP10 (CXCL10) (55,9+/-2,8 vs 22+/-4,8 пг/мл), IL1b (47,9+/-2,8 vs 1,5+/-0,4 пг/мл), IL15 (41,9+/-2,8 vs 2,4+/-0,4 пг/мл), IFNg (32+/-2,8 vs 2,8+/-0,7 пг/мл), CCL5 (59,9+/-2,8 vs 12,1+/-7,5 пг/мл)) и повышение противовоспалительных факторов (IL4 (50,9+/-2,8 vs 193,6+/-70,8 пг/мл), GCSF (26,9+/-2,8 vs 44,5+/-11,9 пг/мл)).

Таким образом, TGFb1 может способствовать противовоспалительному профилированию секретом клеток кардиосфер. Прекондиционирование клеток кардиосфер с помощью TGFb1 может служить основой для создания подходов для разработки препаратов с противовоспалительными свойствами направленного действия (на основе компонентов секретом) для лечения заболеваний различной этиологии. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-15-00384 «Исследование механизмов активации эпикарда при повреждении сердца и возможности стимулировать репаративный ангиогенез и репарацию миокарда после ишемического повреждения путем активирующих воздействий на эпикард».

ДЕФИЦИТ РЕЦЕПТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА ВЕДЕТ К НАРУШЕНИЮ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ ВАСКУЛОГЕННЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ, РАЗВИТИЮ ВАСКУЛОПАТИИ И ФИБРОЗА В СЕРДЦЕ МЫШИ

К.В. Дергилев, И.Б. Белоглазова, З.И. Цоколаева, Ю.Д. Гольцева, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: урокиназный рецептор, васкулопатия, фиброз

Активатор плазминогена урокиназного типа и его рецептор (uPAR) образуют интегрированный на клеточной мембране мультимолекулярный комплекс, который выполняет как протеолитическую, так регуляторные функции, необходимые для поддержания тканевого гомеостаза.

Цель: исследовать участие uPAR в реализации ангиогенных свойств васкулогенных клеток-предшественниц (ВКП) и развитии кардиального фиброза.

В работе использованы ВКП, полученные из сердец uPAR-/- и мышей дикого типа, и охарактеризованные с помощью методов проточной цитофлуориметрии, ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга, иммуноцитохимии, микрээррей анализа, подходов для оценки ангиогенных свойств (tube assay, трансплантация клеток в составе матригеля). Исследование уровня васкуляризации миокарда и фиброза выполнялось с помощью иммуногистохимических и гистологических методов с последующим анализом в программе Image J. Диастолическая функция сердца оценивалась с помощью ЭХОКГ.

Сравнительное исследование показало, что в сердце uPAR-/- животных наблюдается снижение числа капилляров и артериол в сравнении с животными дикого типа. Мы также обнаружили, что у uPAR-/- мышей наблюдается снижение числа васкулогенных клеток-предшественниц (ВКП). Мы показали, что uPAR-/- ВКП имеют признаки сниженной жизнеспособности, более легко способны вступать в апоптоз, имеют сниженную секрецию проангиогенных факторов роста (VEGF, ангиогенинов и ангиопоэтинов) и подавленную способность к ангиогенезу in vitro и in vivo. Кроме того, у uPAR-/- мышей снижение ангиогенного поведения клеток сочеталось с признаками интерстициального фиброза в сочетании с развитием диастолической дисфункции, чего не наблюдалось у животных дикого типа.

Таким образом, дефицит uPAR ведет к нарушению ангиогенного поведения ВКП и васкулопатии, что может лежать в основе развития интерстициального фиброза в сердце. uPAR-/- мыши могут рассматриваться в качестве модели для изучения молекулярных механизмов развития кардиального фиброза и недостаточности с сохраненной фракцией выброса. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 21-15-00327 «Изучение механизмов формирования профиброзного микроокружения сердца на модели кардиосфер: роль урокиназного рецептора».

РЕЦЕПТОР АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА НА ПЕРЕПУТЬЕ МЕЖДУ РЕПАРАЦИЕЙ И ПАТОЛОГИЕЙ СЕРДЦА

К.В. Дергилев, Е.В. Парфенова

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: doctorkote@gmail.com

Ключевые слова: урокиназный рецептор, фиброз.

В последнее десятилетие новым перспективным направлением биомедицинских исследований стала клеточная терапия. В ее основе лежит использование различных видов стволовых/прогениторных клеток, которые как сами могут быть трансплантированы и использованы для реконструирования тканей, так и служить инструментов для переноса факторов, активирующих эндогенные механизмы репарации. Между тем, механизмы

регуляции поведения стволовых/прогениторных клеток в организме изучены крайне мало, что в ряде случаев не позволяет добиться высоких показателей эффективности клеточной терапии в практике. Причиной этого может служить наличие сложных путей вне- и внутриклеточной сигнализации, регулирующих их уникальные свойства, одной из которых является урокиназная система. Урокиназная система, состоит из активатора плазминогена урокиназного типа, ее рецептора (uPAR) и ингибиторов. Уникальность этой системы заключается в том, что большинство клеточных ответов, модулированных этой системой, требуют трансмембранной сигнализации, которая опосредуется взаимодействием uPAR с множеством вне-/внутриклеточных белков и мембранных рецепторов, обеспечивающих передачу разнонаправленных эффектов. В сообщении рассмотрены возможные пути влияния uPAR на свойства репаративного пула клеток сердца и механизмы, приводящие к развитию патологии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-29-04164 «Разработка модели эпикардального сфероида (эпироида) для изучения влияния воспаления и патологических факторов риска сердечной недостаточности на эпикардальное микроокружение и механизмы репарации сердца».

ОТВЕТ ТРАНСКРИПТОМА КЛЕТОК МОЗГА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ МЕЛАНКОРТИНОВОГО РЯДА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Л.В. Дергунова, И.Б. Филиппенков, Н.Ф. Мясоедов, С.А. Лимборская

ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: lvd@img.ras.ru

Ключевые слова: ишемия мозга, нейропротекция, tMCAO, АКТГ(4-7)PGP (семакс), АКТГ(6-9)PGP, функциональная геномика, транскриптомика, полногеномный анализ транскриптома (RNA-Seq).

В настоящее время все большее значение придается разработке лекарственных средств на основе естественных регуляторных пептидов. Их преимущество связано с мягкостью действия и отсутствием побочных эффектов. Большинство из них, в отличие от других лекарств, не имеет в организме четко обозначенной молекулярной мишени действия. Они обладают множественным действием, оказывая влияние одновременно на различные группы рецепторов. Особое внимание уделяется пептидным препаратам, которые способствуют восстановлению неврологических функций после острого нарушения мозгового кровообращения (инсульт). Большой вклад в изучение особенностей действия пептидов вносит метод полногеномного анализа транскриптома (RNA-Seq). Применение RNA-Seq позволило нам ранее существенно детализировать механизмы действия пептидного препарата семакс, успешно применяющегося для лечения инсульта [1]. Семакс представляет собой синтетическое производное проопиомеланокортина, на N-конце которого находится фрагмент АКТГ(4-7), а C-конец стабилизирован присоединением трипептида Pro-Gly-Pro (PGP).

Целью данной работы был сравнительный анализ воздействия семакса и пептида меланокортинового ряда АКТГ(6-9)PGP на транскриптом в отделах мозга крыс, находящихся в нормальных физиологических условиях

и при обратимой церебральной ишемии (tMCAO). Модель tMCAO у крыс была основана на эндоваскулярной окклюзии правой средней мозговой артерии монофиламентом в течение 90 мин с последующей реперфузией (22,5 ч). По результатам патоморфологического исследования срезов мозга крыс, подвергнутых tMCAO, для транскриптомного анализа эффектов пептидов использовали дорсолатеральные участки лобной коры правого полушария, которые включали как пенумбру, так и неповрежденную кору. Для исследования транскрипционной активности клеток мозга крыс под действием пептидов в норме использовали участки коры правого полушария, аналогичные взятым у животных с ишемией.

Выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся в дорсолатеральных участках лобной коры в норме и спустя 24 ч после tMCAO при введении пептидов семакса и АКТГ(6-9)PGP. Обнаружены гены и связанные с ними сигнальные пути, как общие для анализируемых пептидов, так и специфические для каждого из них. Показано, что ответ генома на воздействие пептидов тем масштабнее, чем более сильное воздействие оказывают на модуляцию геномной активности патологические процессы, протекающие в организме животного. Установлен компенсаторный эффект семакса и АКТГ(6-9)PGP на транскрипционную активность генов воспаления и иммунного ответа, нарушенную действием ишемии, что может быть одним из проявлений нейропротективных свойств пептидов. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00268-П.

Литература:

1. Filippenkov IB, Stavchansky VV, Denisova AE et al. Genes. 2020. V. 11. № 6. P. 681.

СТАРЕНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НАРУШАЕТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ ЭНДОМЕТРИА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА

П.И. Дерябин, А.В. Бородкина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: borodkina618@gmail.com

Ключевые слова: эндометриальные стромальные клетки, старение, децидуализация, сенолитики, сеноморфики, имплантация, бластоциста.

Для успешной имплантации необходимо двустороннее взаимодействие между генетически нормальным эмбрионом и рецептивным эндометрием. На клеточном уровне рецептивность эндометрия подразумевает регулируемую гормонами дифференцировку эндометриальных стромальных клеток (эСК) в децидуальные клетки, которые создают подходящее микроокружение для инвазирующего эмбриона. Известно, что нарушение децидуализации может опосредовать неудачи имплантации. В настоящем исследовании мы показали, что старение эСК может быть причиной нарушения децидуализации стромы эндометрия и может негативно влиять на последующую имплантацию [1]. Используя донорские линии эСК, мы обнаружили обратную зависимость между старением эСК и их способностями децидуализоваться и принимать бластоцисто-подобные сфероиды. Снижение восприимчивости стареющих эСК к действию гормонов нарушало динамику децидуализации,

что приводило к изменению рецептивности, нарушению появления субпопуляций зрелых и стареющих децидуальных клеток, нарушению лиганд-рецепторного взаимодействия с трофобластами и изменению архитектуры внеклеточного матрикса, что препятствовало инвазии модельных бластоцист. Кроме того, за счет измененной паракринной активности стареющие эСК негативно влияли на децидуализацию соседних здоровых клеток, усиливая дисфункцию стромального компартмента эндометрия. Для устранения негативного влияния стареющих эСК на функционирование эндометрия был протестирован ряд соединений с сенолитической активностью, то есть способных направлено инициировать гибель в стареющих клетках. Однако ни одно из протестированных соединений с заявленной сенолитической активностью не оказало желаемого эффекта на стареющие эСК [2]. В качестве альтернативного подхода были использованы сеноморфики, которые в отличие от сенолитиков уменьшают выраженность фенотипических проявлений стареющих клеток, но не влияют при этом на их жизнеспособность. Использование классических сеноморфных препаратов значимо уменьшило негативное влияние стареющих эСК на децидуализацию клеток и имплантацию модельных бластоцист. В перспективе использование сеноморфиков и разработка сенолитиков, специфичных для стареющих эСК, могут рассматриваться как подходы для повышения эффективности имплантации. Важно, что такие стратегии являются уникальными и не имеют аналогов в мировой практике. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-74-10038.

Литература:

1. Deryabin P.I., Borodkina A.V. Hum Reprod. 2022. V. 37. P. 1505–1524.
2. Deryabin P.I., Shatrova A.N., Borodkina A.V. Cell Mol Life Sci. 2021. V. 78. P. 7757–7776.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА БАЗЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК)

С.С. Джауари¹, Н.А. Басалова^{1,2}, М.Н. Скрябина¹, Н.А. Александрюшкина^{1,2}, В.Ю. Балабаньян^{1,2}, В.С. Попов^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}, Н.В. Данилова¹, П.Г. Мальков¹, В.А. Ткачук^{1,2}, М.Н. Карагяур^{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

e-mail: stalik.djauari@yandex.ru

Ключевые слова: геморрагический инсульт, секретом, МСК, микроглия.

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются одной из основных причин смертности и инвалидизации людей в мире. По этиологии и патогенезу выделяют две основные формы ОНМК: ишемическую и геморрагическую. Для более распространенной ишемической формы ОНМК (ишемический инсульт) существуют лекарственные препараты и достаточно эффективные терапевтические подходы. В то же время для ОНМК, ассоциированных с излиянием крови в паренхиму мозга (геморрагический инсульт), менее распространенных,

но клинически более тяжелых, эффективного специфического лечения не существует.

Из данных литературы известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются ключевыми регуляторами процессов регенерации поврежденных тканей, при этом неоднократно было показано, что, в основном МСК реализуют свое стимулирующее действие на процессы регенерации через секрецию факторов роста, цитокинов, белков матрикса и пр. Терапевтическая активность МСК и продуктов их секреции (секретом) настолько значима, что предпринимаются попытки их использования для стимуляции регенерации тканей, в том числе периферических нервов и ткани мозга.

В данном исследовании нами был изучен нейропротективный потенциал секретом МСК на экспериментальной модели интрацеребральной гематомы у крыс. Секретом МСК вводили в область повреждения через 5 минут после моделирования интрацеребрального кровоизлияния по А.Н. Макаренко. За животными наблюдали в течение 14 дней после моделирования инсульта. Оценивали выживаемость, тяжесть неврологических дефицитов, объем повреждения головного мозга по данным МРТ и гистологического исследования.

Было установлено, что секретом МСК, введенный в область повреждения, предотвращает гибель экспериментальных животных и снижает тяжесть неврологических нарушений, а также уменьшает объем повреждения головного мозга, хотя и наблюдается видоспецифичность данного эффекта. Исследование механизма нейропротективного действия секретом МСК показало, что он способен стимулировать выживание нейронов в условиях глутамат-опосредованной нейротоксичности и снижать степень активации клеток микроглии, предотвращая прогрессирование вторичного повреждения ткани мозга. Полученные результаты позволяют рассматривать секретом МСК, как перспективный препарат для лечения геморрагического инсульта и других острых повреждений мозга.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ E2F1 В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

В.А. Дзреян, М.А. Питинова

Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

e-mail: dzreyan2016@mail.ru

Ключевые слова: апоптоз, ганглии задних корешков, E2F1, нейротравма, аксотомия, DRG.

Нейротравма является одной из основных причин инвалидности и смертности человека. Однако механизмы, опосредующие выживание и гибель клеток периферической нервной системы, до сих пор полностью не изучены. Эффективных нейропротекторов для защиты нервных клеток в первые часы после травмы на сегодняшний день не существует [1,2]. В ядре клетки E2F1 как фактор транскрипции контролирует экспрессию различных белков, регулирующих многие процессы, в том числе апоптоз. Но в цитоплазме E2F1 может действовать не транскрипционным путем, напрямую взаимодействуя с митохондриями [3]. Однако, участие E2F1 в регуляции выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при аксотомии ранее не изучалось.

Целью нашей работы явилось: изучить изменения экспрессии и локализации E2F1 в ганглиях задних корешков крыс (DRG) в ответ на перерезку седалищного нерва.

Опыты проведены на самцах крыс линии Wistar (2–2,5 месяцев; 200–250 г), на которых уже отработана методика перерезки седалищного нерва в нашей лаборатории [4,5]. Декапитацию гильотиной проводили через 1, 4, 24 часа или 7 дней после односторонней перерезки правого седалищного нерва. Контроль — симметричные ганглии с контралатеральной стороны того же животного. Уровень экспрессии E2F1 оценивали с помощью иммуноблоттинга и двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Уровень апоптоза оценивали методом TUNEL. Статистический анализ проводили по One Way Anova RM.

По результатам данной работы аксотомия вызывает гиперэкспрессию E2F1 уже через 4 часа после аксотомии, тогда как к 7 суткам уровень белка стремится к минимуму. При этом, уровень экспрессии E2F1 повышался как в цитоплазме, так и в ядрах клеток DRG. Наши данные указывают на то, что E2F1 является важной терапевтической мишенью, поскольку проведенные исследования продемонстрировали участие фактора транскрипции E2F1 в запуске апоптоза нейронов и глиальных клеток DRG после аксотомии.

Наши новые данные указывают на то, что E2F1 может быть потенциальным биомаркером на ранних стадиях после нейротравмы, предполагая, что ингибиторы E2F1 могут быть рассмотрены для терапевтических подходов в ранний период после повреждения. Такая стратегия будет направлена на спасение клеток от гибели и иметь терапевтический эффект, например, на восстановление количества нейронов после нейротравмы, как концептуальная альтернатива трансплантации клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028 и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

Литература:

- Esposito MF, Malayil R, Hanes M, Deer T. Pain Med. 2019 Jun 1; 20(Suppl 1): S23-S30.
- Martin SL, Reid AJ, Verkhatsky A et al. Neural Regen Res. 2019 Jun; 14(6): 939–947.
- Polager S, Ginsberg D. Nat. Rev. Cancer. 2009 Oct; 9(10): 738–48.
- Dzreyan VA, Rodkin SV, Pitinova MA et al. Mol Neurobiol. 2021 Jan; 58(1): 217–228.
- Dzreyan V, Rodkin S, Nikul V et al. J Mol Neurosci. 2021 Apr; 71(4): 826–835.

ЦИТОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ БИОСОВМЕСТИМОСТЬ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ-МАТРИКСОВ ДЛЯ ИМПЛАНТОЛОГИИ С МСК ЧЕЛОВЕКА

Н.Н. Диденко, А.А. Долгалев, Д.В. Бобрышев, С.Р. Адешелидзе

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

e-mail: nikolai.n.didenko@gmail.com

Ключевые слова: МСК, коллагеновый гель, биосовместимость, материалы-матрицы, имплантология.

Целый ряд уникальных качеств (возможность распознавания сигналов клеток, биоразлагаемость,

механические свойства) делают коллаген уникальным материалом для регенеративной медицины [1]. Изучаемый нами коллагеновый гель представляет собой прототип имплантируемого медицинского изделия. Это гелеобразное вещество на основе внеклеточного матрикса (ВКМ) из коллагена (преимущественно I и III типов) ксеногенного происхождения и стерильного физиологического раствора. Внеклеточный матрикс получен путем глубокой очистки (многоступенчатая химико-биологическая обработка), децеллюляризации и фрагментации ксеногенного сырья. Источником сырья для изготовления ВКМ являются перикард крупного рогатого скота (КРС) и подслизистой тонкой кишки (ПТК) свиньи [2].

Первичные культуры МСК человека культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в пластиковых культуральных флаконах площадью 25 см², содержащих полную питательную среду. На третьем пассаже клетки высевались на образцы исследуемых материалов и культивировались в течение 96 ч.

Подсчет клеток и уровня их жизнеспособности проводился при помощи автоматического счетчика LounaFL (LogosBio) с использованием окрашивания трипановым синим. Для оценки пролиферативной активности клеток применяли люминесцентный анализ уровня АТФ с использованием набора реагентов ATPlite 1 step (PerkinElmer) при помощи фотометра-имиджера Cytation 1 (BioTek). Для оценки миграционной активности использовали анализ на «заращение раны» (scratch test).

По результатам проведенного исследования показано, что опытные образцы гелей из перикарда КРС и ПТК свиньи не обладают цитотоксичностью, не препятствуют митотической активности и пролиферации МСК человека. Полученные данные дают основание проводить исследования эффективности и безопасности опытных образцов изделия в экспериментах in vivo на лабораторных животных.

Литература:

- Asd Chu C., Deng J., Sun X. et al. Tissue Eng Part B Rev. 2017. V. Oct. №. 23(5). P. 421.
- Долгалев А.А., Бойко Е.М., Бобрышев Д.В. и др. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2022. Т. 17. № 1. С. 74.

ЭКСПРЕССИЯ ОНКОМАРКЁРНОГО БЕЛКА В23 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПЛОТЯДНЫХ

О.В. Дилекова, В.В. Митенко

Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Россия

e-mail: mitenko.vas@yandex.ru

Ключевые слова: кошка, собака, опухоль молочной железы, нуклеофозмин, экспрессия

Исследования были проведены с 2021 по 2022 гг. Объектом исследования служили плотоядные животные с новообразованиями молочных желез (собаки (n=28), кошки (n=25)), которые были пациентами ветеринарных клиник г. Ставрополя. Возраст животных составлял от 7 до 15 лет.

В 42% случаев у собак пород: немецкая овчарка, пудель, доберман, метис, при патогистологическом исследовании была диагностирована — аденокарцинома высокодифференцированная (G1) — 66% до умеренно-дифференцированной (G2) — 33%. У кошек в 64% случаев породы: сиамская, сфинкс, бенгальская, метис, были установлены при исследовании аденокарцинома высокодифференцированная (G1) — 16%,

умеренно-дифференцированная (G2) — 24% и низкодифференцированная (G3) — 24%. При постановке патогистологического диагноза использовалась Международная гистологическая классификация и номенклатура опухолей домашних животных ВОЗ (1975).

Экспрессия белка B23 у кошек выявляется в эпителиальном компоненте, проявляется сильным окрашиванием (+3), занимает больше 10% площади опухоли. Иммунопозитивный материал имеет ядрышковую локализацию в количестве от 1 до 2-х, с выраженным анизонуклеозом. Отмечается наличие маркера в цитоплазме в виде гранул. У собак экспрессия B23 имеет от сильного (+3) до умеренного окрашивания (+2) и занимает также больше 10% от площади опухолей. Количество ядрышек насчитывается от 1 до 3-х.

Таким образом, фактор транскрипции B23 в опухолях молочной железы у собак и кошек имеет эпителиальную локализацию, выявленную во внутриядерном субкомпарimente. По нашему мнению, выявленные изменения связаны с нарушением сигнального пути от ErbB1 к нуклеофозмину в клетках, что приводит к генетическому дисбалансу и возникновению опухолей [1, 2, 3].

Литература:

1. Зенит-Журавлева Е.Г., Полковниченко Е.М., Лушников А.А. Молекулярная медицина № 4, 2012.
2. Якунина М.Н. Опухоли молочной железы собак и кошек. 2 изд., испр. М: Onebook.ru, 2014.
3. Keren Farin, Ayelet Di Segni, Adam Mor Structure-Function Analysis of Nucleolin and ErbB Receptors Interactions. Published: July 3, 2009.

УЧАСТИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ МАТКИ КРЫС

**С.В. Диндяев¹, Д.В. Касаткин²,
Ф.А. Ромашин¹, Т.С. Пупышева¹**

¹ ФГБОУ ВО Ивановская государственная медицинская академия Минздрава России, Иваново, Россия

² Урологический центр «Уромед», Иваново, Россия

e-mail: dindyayev@ivgma.ru

Ключевые слова: гистамин, серотонин, матка крыс, беременность, послеродовой период, апоптоз.

С помощью флуоресцентно-гистохимическим методов Фалька-Хилларпа и Кросса-Эвана-Роста исследовано содержание гистамина и серотонина в клеточных элементах слизистой и мышечной оболочек тела матки крыс в течение беременности и послеродового периода. Наиболее высокий уровень гистамина в тучных клетках слизистой и мышечной оболочек, в гладких миоцитах миометрия наблюдается перед родами и сразу после них. Для показателей, оценивающих плотность тучных клеток и содержание в них гистамина, характерна отрицательная взаимосвязь, как во время беременности, так и после родов ($R = -0,807 - 0,814$). В то же время для изменений содержания гистамина в тучных клетках и гладких миоцитах миометрия свойственна высокая положительная взаимосвязь. После образования гистамин связывается рабочими клетками, превращается в неактивную форму или разрушается ферментом диаминооксидазой или гистаминазой [1]. Отмечено, что при любом способе инактивации гистамина образуются активные формы кислорода, которые могут вызывать

макромолекулярные повреждения и старение клеток, особенно если в их микроокружении мало молекул антиоксидантов [2]. Возможно, это способствует апоптозу миоцитов во время послеродовой инволюции матки.

Максимальное содержание серотонина в эпителиоцитах эндометрия отмечается на 7-е сутки беременности. Начиная со вторых суток после родов, происходит значительное снижение содержания серотонина и гистамина в эпителиоцитах эндометрия со стабилизацией этого показателя на 7–8-е сутки. Серотонин в гладких миоцитах миометрия достоверно выявляется только в 1-е, 10-е и 15-е сутки после родов. По результатам нашего исследования к 5-м суткам послеродового периода значительно снижается частота клеток мышечной оболочки с положительной экспрессией гена p53 апоптоза.

Тучные клетки матки являются основным источником гистамина и серотонина в тканях матки. Поддержание гистаминопосредованной аутокринной регуляции секреции тучных клеток является одним из ключевых факторов поддержания пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток матки.

Литература:

1. Грачев В.И., Маринкин И.О., Суслонина Н.В. Norwegian Journal of development of the International Science. 2019. № 31. С. 20–34.
2. Moya-García A.A., Pino-Ángeles A., Sánchez-Jiménez F. et al. Biomolecules. 2021. Vol. 11(3). P. 415. <https://doi.org/10.3390/biom11030415>

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ NOTCH И BMP В ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНОМ ПЕРЕХОДЕ

П.М. Докшин^{1,2}, А.Б. Малашичева^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: pdocshin@icloud.com

Ключевые слова: эндотелиально-мезенхимный переход, сигнальный путь Notch, передача сигналов Bmp, мезенхимные клетки сердца, сердечный фиброз.

Эндотелиально-мезенхимный переход (ЭндМП) является одним из ключевых событий, происходящих в сердце как при развитии органа, так и его поломке. В эндМП вовлечено множество сигнальных путей, которые активно модулируют процесс, и наиболее важным является сигнальный путь Notch, который представляет собой ключевой регулятор эндМП при миокардиальном фиброзе [1]. Передача сигналов Notch это эволюционный консервативный путь межклеточной коммуникации, участвующий в выборе клеточной судьбы посредством лиганд-рецепторных взаимодействий между трансмембранными молекулами соседних клеток. Сердечный фиброз формируется в результате развивающейся сердечной недостаточности, например, возникшей в следствии инфаркта миокарда, и характеризуется избыточным отложением коллагена, что становится причиной ремоделирования органа. Ранее мы отмечали [2], что в процессах раннего ремоделирования миокарда участвует фактор BMP2 из суперсемейства TGF- β . Сигнальный каскад, индуцированный TGF- β , является также важным регуляторным путем в инициации и развитии эндМП [3]. Взаимодействуют ли сигнальный путь Notch и BMP2 между собой в процессах эндМП остаётся неясным.

Целью работы было изучить влияние попеременной активации сигнального пути Notch и *Vmp2* в мезенхимных клетках сердца (МКС) и эндотелиальных клетках пупочной вены человека (ПВЭК) при моно- и сокультуривании. Трансдукцию клеток осуществляли с использованием лентивирусных векторов, несущих целевые последовательности к NICD и *VMP2*. Оценку активации маркеров эндМП проводили с помощью ПЦР с обратной транскрипцией, а также окрашивали клетки на α -SMA иммуноцитохимическими методами.

Экзогенная активация NICD привела к повышению уровня компонентов сигнального пути Notch, а индукция сигнального пути *Vmp2* усилило экспрессию фактора *Vmp2*, но при двойной трансдукции эффект активации был наиболее выраженным в обеих культурах. При сокультуривании, наоборот, уровень маркеров эндМП был более умеренным, чем отразилось пониженной экспрессией α -SMA.

Таким образом, уровни экспрессии сигнального пути Notch и *Vmp2* оказывают влияние на выраженность маркеров эндМП, и при одновременной активации обеих передач сигналов, усиливаются клеточные эффекты как в МКС, так и в ПВЭК.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ № 20-015-00574.

Литература:

1. Cheng, W.; Li, X.; Liu, D.; Cui, C.; Wang, X. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2021, 26, 3–11.
2. Docshin, P.M.; Karpov, A.A.; Mametov, M. v.; Ivkin, D.Y.; Kostareva, A.A.; Malashicheva, A.B. *Biomedicines* 2022, 10, 1283.
3. Mercado-Pimentel, M.E.; Runyan, R.B. *Cells Tissues Organs* 2007, 185, 146–156.

СОСТАВ ПОВЕРХНОСТИ И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ АДДИТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

**А.А. Долгалева¹, Д.В. Бобрышев¹,
Д.З. Чонишвили², Н.Н. Диденко¹,
М.Г. Амбарцумов³, Ю.А. Сергеев¹**

¹ ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Ставрополь, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-Осетинский государственный университет им. Коста Левановича Хетагурова, Владикавказ, Россия

³ ФГАУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

e-mail: dolgalev@dolgalev.pro

Ключевые слова: дентальные имплантаты, остеоинтеграция, поверхность имплантата, защитные покрытия, аддитивные технологии.

К аддитивным технологиям [1–5], которые сегодня активно развиваются в области создания металлических имплантатов, относятся такие методы, как селективное лазерное плавление и электронно-лучевая плавка.

Целью нашего исследования явилось исследование свойств образцов материалов из порошка сплава титана ВТ 6, полученных методами: селективного лазерного плавления (СЛП) и электронно-лучевой плавки (ЭЛП).

Материалом для исследования являлись образцы, сделанные в виде металлических шайб размером

10 мм в диаметре и 2 мм в высоту, полученные из порошка сплава титана марки ВТ 6 методом селективного лазерного плавления — 20 штук, методом электронно-лучевой плавки — 20 штук и шайбы, полученные из компактного титана марки ВТ 6 — 20 штук.

Исследование морфологии поверхности образцов проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Mira 3 LMH при величине ускоряющего напряжения 10 кВ в режиме регистрации вторичных электронов с помощью детектора SE.

Исследование элементного состава образцов было проведено с помощью системы AZtecEnergy Standard / X-max 20, установленной на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira 3 LMH, при величине ускоряющего напряжения 20 кВ и величине рабочего расстояния 15 мм.

Исследование биосовместимости проводили определяя пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения MS Excel 2016 с использованием методов описательной статистики).

Результаты исследований

1. Образцы, изготовленные из одного порошка сплава титана ВТ 6, но с применением разных методов аддитивных технологий, отличаются как по химическому составу, так и по биологической совместимости.

2. Отсутствие на поверхности образца, изготовленного методом СЛП, атомов алюминия и ванадия существенно увеличивает пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток.

3. Элементный состав поверхности образцов, изготовленных методом ЭЛП, соответствует элементному составу образца из компактного титана марки ВТ 6, что говорит о перспективах применения данного материала для изготовления имплантатов, работающих в режиме функциональных нагрузок.

Литература:

1. Купряхин С.В. Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. 2019. № 1 (37).
2. Корыткин А.А., Орлинская Н.Ю., Новикова Я.С. и соавт. *Соврем. технол. мед.* 2021. № 2.
3. Волова Л.Т., Трунин Д.А., Пономарева Ю.В. и соавт. Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. 2017. № 5 (29).
4. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Николаенко А.Н. и соавт. *Клиническая и экспериментальная хирургия*, vol. 6, no.2, 2018, pp. 67–73. doi:10.24411/2308-1198-2gevp018-12009
5. Matveeva, N. Y., Kalinichenko, S. G., & Kostiv, R. E. (2021). *Bulletin of experimental biology and medicine*, 171(4), 559–565.

РАЗРАБОТКА ТРЕХМЕРНОЙ МОДЕЛИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

**А.П. Домнина, И.К. Кунеев,
Ю.С. Иванова, О.Л. Люблинская**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: aldomnina@mail.ru

Ключевые слова: эндометрий, децидуальная дифференцировка, 3D культивирование, клеточные сфероиды.

Проблема сохранения и восстановления репродуктивного здоровья женщин заслуживает особого внимания на современном этапе социального и экономического развития общества. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области вспомогательных репродуктивных технологий, благополучный исход беременности наблюдается далеко не у всех пациенток, проходящих лечение от бесплодия. Одним из важнейших факторов в патогенезе репродуктивных дисфункций у женщин является нарушения функции эндометрия. Эндометрий — это внутренняя оболочка матки, которая при гормональной стимуляции подвергается децидуальной трансформации, обеспечивающей имплантацию эмбриона в случае зачатия и дальнейшее поддержание беременности. Для изучения эндометрия в норме и при патологии разработаны модели выделения и культивирования клеток эндометрия *in vitro*. Однако в основном, культивируемые модели эндометрия представляют из себя монокультуры отдельных типов эндометриальных клеток в виде клеточного монослоя. Актуальным направлением современной клеточной биологии является переход к исследованию трехмерных (3D) клеточных моделей, наиболее близких по архитектуре к тканям организма человека. Одной из таких моделей является культивирование клеток в сфероидсах. Нами разработана технология формирования стандартизированных по размеру сфероидов из клеток эндометрия, с узко дисперсным распределением по размеру, позволяющая сформировать сфероиды заранее заданного размера. На основе данной технологии разработана функциональная 3D модель эндометрия, отличающаяся наличием в своем составе основных клеточных компонентов и экстраклеточного матрикса, характерных для эндометрия человека, а также возможностью достичь плотности клеточного материала, сравнимой с нативной тканью. В качестве основы трехмерной конструкции используется модель культивирования клеток эндометрия в виде сфероидов, помещенных в коллагенизированный скаффолд на основе целлюлозы, полученный из децеллюляризованного яблока. Функциональность данной модели подтверждена способностью клеток в составе конструкции отвечать на гормональную стимуляцию тканеспецифической децидуальной дифференцировкой. Кроме этого, данная конструкция позволяет смоделировать 28-дневный менструальный цикл в культуре. Культивирование данной модели возможно как с использованием стандартной культуральной среды, так и в средах, не содержащих компоненты животного происхождения. Так же нами создана такая модель с использованием клеток, полученных от доноров с эндометриозом, заболеванием характеризующимся разрастанием ткани эндометрия за пределы полости матки. Разработка технологии формирования данной ткане-инженерной конструкции имеет как фундаментальное, так и прикладное значение для изучения эндометрия в норме и при патологии. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10126.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ВАКЦИНЫ

А.Б. Доржиева, Г.В. Селедцова

*НИИ Фундаментальной и Клинической Иммунологии,
Новосибирск, Россия*

e-mail: dorzhieva-ayana@yandex.ru

Ключевые слова: онкология, опухолеассоциированные антигены, противоопухолевая вакцинация, противоопухолевый иммунитет.

Разработка новых лекарственных препаратов с исключительно точечными мишенями в опухолевых клетках не сможет сыграть ключевой роли в эффективном лечении, поскольку внутриклеточные биохимические сигнальные пути одинаковы у опухолевых и нормальных клеток. Тем не менее, опухолевые клетки могут отличаться от нормальных клеток по количеству и качеству иммунологических маркеров (антигенов, АГ). Специфическими маркерами опухолей разного генеза являются АГ, которые в здоровом организме присутствуют в клетках яичка. [1]. Эти опухолеассоциированные АГ (ОАА) играют важную роль в поддержании высокой ростовой и инвазивной активности опухолевых клеток.

Большинство ОАА представлено эволюционно консервативными молекулами, поэтому регистрируется высокая степень гомологии между ОАА человека и животных. Но структурные межвидовые отличия ОАА можно выгодно использовать для повышения иммуногенности противоопухолевых вакцин. Показано, иммунизация мышей человеческими, но не мышинными, меланома-ассоциированными гликопротеинами gp75 и gp 100, способна предотвращать развитие в их организме меланомы B16 [2]. В обратной ситуации мышинные ОАА могут быть более эффективными индукторами иммунных реакций у пациентов в сравнении с их человеческими аналогами. В нашей работе мы использовали клетки яичка барана для индукции перекрестных иммунологических реакций против ОАА у мышей-опухоленосителей.

Мышей первоначально иммунизировали ксеногенным липосомальным тестикулярным АГ, полученным из тестикул барана (основная группа) и сингенным тестикулярным АГ мыши (сингенный контроль). Через месяц после вакцинации мышам была привита опухоль LLC, контрольной группе мышей были введены только опухолевые клетки. 50% выживаемость мышей сингенной и контрольной групп составила 20–25 дней. Мыши в экспериментальной группе прожили вдвое дольше, примерно 41–43 дня, а у 20% из них опухоль вообще не развилась. В спленоцитах мышей, у которых не было опухолей после вакцинации липосомной тестикулярной вакциной, было определено количество Т-регуляторных (Treg) и Т-клеток памяти.

Обнаружено достоверное снижение более чем вдвое как наивных Т-reg (CD4+CD25+), так и активированных (CD4+CD25+Foxp3+) в лимфоцитах мышей, вакцинированных ксеногенными тестикулярными АГ по сравнению с лимфоцитами мышей, полученных из интактной селезенки. Аналогичная динамика показателей была обнаружена при определении Т-клеток памяти.

Содержание IFN-гамма и IL-10 в супернатантах мышинных спленоцитов, полученных от ксеновакцинированных мышей без опухолей, было исследовано и показало достоверное снижение количества IL-10, но не IFN-гамма.

Литература:

1. Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V. et al. *Vaccine*. 2014. V. 32. P. 4015–4024.
2. Hsueh E.C., Morton D.L. *Semin Cancer Biol*. 2003. V.13. P. 401–407.

РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИЦАХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ В ДЕБЮТЕ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова

ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: dorofeyeva.alyona@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, колониобразующие единицы фибробластов, экспрессия генов, апластическая анемия.

Апластическая анемия (АА) — редкое заболевание системы крови, характеризующееся панцитопенией и аплазией костного мозга (КМ). Выделяют три формы АА: нетяжелая (НАА), тяжелая (ТАА) и сверхтяжелая. Хотя патогенез заболевания недостаточно изучен, считается, что в основе его лежит гибель стволовых кроветворных клеток (СКК) в результате аутоиммунной атаки цитотоксических Т-лимфоцитов. Другой причиной аплазии КМ при АА может быть нарушение функционирования стромального микроокружения. Для изучения свойств стромы КМ *in vitro* выделяют предшественники двух типов: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф). Известно, что в ММСК из КМ больных АА изменен относительный уровень экспрессии (ОУЭ) ряда генов, однако КОЕф больных охарактеризованы недостаточно. Данные о свойствах стромальных предшественников при разных формах АА в литературе также отсутствуют. Цель работы — проанализировать ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией, дифференцировкой, иммунорегуляцией и поддержанием СКК, в ММСК и КОЕф из КМ больных АА в дебюте заболевания и выявить отличия, характерные для НАА и ТАА, а также общие для обеих форм изменения, по сравнению со здоровыми донорами.

Из КМ 17 больных НАА (8 мужчин, 9 женщин, $33,8 \pm 2,2$ лет), 10 больных ТАА (7 мужчин, 3 женщины, $30,7 \pm 4,6$ лет) и 22 здоровых доноров (11 мужчин, 11 женщин, $29,9 \pm 2,5$ лет) получили ММСК и КОЕф по стандартным методикам. Из ММСК и КОЕф выделяли РНК и строили кДНК, которую анализировали методом ПЦР в реальном времени. ОУЭ генов рассчитывали методом $\Delta\Delta Ct$, используя для нормализации гены *GAPDH* и *BACT*.

В ММСК всех больных АА достоверно повышен ОУЭ фактора комплемента Н (*CFH*), промежуточного филемента нестина (*NES*), рецепторов к факторам роста фибробластов (*FGFR1*, *FGFR2*) и фактору роста, выделенному из тромбоцитов (*PDGFRA*), а также достоверно снижен ОУЭ ангиопозитина-1 (*ANGPT1*) по сравнению с ММСК доноров. В ММСК больных НАА также достоверно повышен ОУЭ *PDGFRA* по сравнению с ММСК ТАА и доноров.

В КОЕф всех больных АА выявлено достоверное повышение ОУЭ рецепторов к факторам роста (*PDGFRA*, *PDGFRB*), а также *NES* по сравнению с донорами. Среди факторов, осуществляющих регуляцию СКК, ОУЭ *ANGPT1* и фактора стволовых клеток (*KITLG*) достоверно повышен, а ОУЭ остеопонтина (*SPP1*) — снижен.

В КОЕф больных ТАА показано достоверное снижение ОУЭ иммунорегуляторных молекул (*IL10*, *IL1B*, *CD274*) и повышение ОУЭ *FGFR1* по сравнению с КОЕф больных НАА и КОЕф доноров.

Таким образом, при АА ММСК и КОЕф по-разному изменены с точки зрения экспрессии генов. При разных формах заболевания наиболее выраженные изменения происходят в различных типах стромальных предшественников: при НАА — в ММСК, при ТАА — в КОЕф, что может быть связано с различиями в патогенезе НАА и ТАА.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МИНИ ПИГОВ, ИМПЛАНТИРОВАННЫЕ ПОД КАПСУЛУ ПОЧКИ, ОБРАЗУЮТ ОЧАГ, СОДЕРЖАЩИЙ КОСТЬ, СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА И МЫШЦЫ

Н.И. Дризе¹, И.Н. Шипунова¹, Н.В. Сац¹, А.И. Дорофеева¹, Н.М. Капранов¹, А.В. Садовская^{1,2}, Ю.В. Ткачук³, А.В. Бондаренко³, М.А. Котский³, И.Б. Капланская⁴, Т.В. Васильева², Н.А. Петинати¹

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

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

³ НИИ Медицины Труда им. Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

⁴ МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии, Москва, Россия

e-mail: ndrize@yandex.ru

Ключевые слова: Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; имплантация, пролиферация, дифференцировка, экспрессия генов

Последние достижения в области исследования стволовых клеток дали стимул для разработки методов регенеративной медицины на их основе, способствующих восстановлению или замене поврежденных тканей и органов. Сравнительные исследования продемонстрировали, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников, включая кости, костный мозг, кожу или жировую ткань человека и свиньи имеют сопоставимые характеристики. МСК хорошо изучены *in vitro*, тогда как их судьба после имплантации не в составе специфических носителей *in vivo* практически не изучена.

В работе изучали свойства МСК из костного мозга мини пигов (КМ-МСК) до и после аутологичной имплантации под капсулу почки. КМ-МСК от четырех мини пигов культивировали, охарактеризовали по поверхностным маркерам и способности к адипогенной и остеогенной дифференцировке. По изученным параметрам КМ-МСК мини пигов не отличались от КМ-МСК человека. Часть клеток от каждого животного трансдуцировали лентивирусным вектором, содержащим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Через 2,5 мес после имплантации КМ-МСК сформировались эктопические очаги, содержащие кости, очаги кроветворения, стромальные клетки костного мозга и мышечные клетки. Все очаги содержали клетки, несущие ген GFP. Это подтверждает их происхождение от имплантированных КМ-МСК. Небольшие кусочки каждого имплантата помещали в 6-ячеечные платы с полной питательной средой. Клетки, вышедшие из этих имплантатов, были культивированы, клонированы по 1 клетке и проанализированы. Эти клетки отвечали большинству критериев МСК (ИМ-МСК). ИМ-МСК продемонстрировали высокий пролиферативный

потенциал, аналогичный КМ-МСК. Способность к дифференцировке ИМ-МСК отличалась от КМ-МСК. Клоны ИМ-МСК не реагировали на индукторы адипогенной дифференцировки, 67% из них дифференцировались в сторону остеогенной линии. Остальные клоны не дифференцировались. Часть клонов ИМ-МСК содержала GFP. ИМ-МСК экспрессировали гены С-МУС и NES значительно выше, чем КМ-МСК, в то время как экспрессия OST4 была ниже. По-видимому, в состав ИМ-МСК входит субпопуляция, обладающая некоторыми свойствами эмбриональных стволовых клеток. Таким образом, КМ-МСК обнаруживали функциональную гетерогенность после имплантации под капсулу почки. Повторный перенос мезенхимных стромальных клеток-предшественников, вероятно, активировал дремлющую субпопуляцию стволовых клеток. Можно заключить, что популяция КМ-МСК состоит из мезенхимных клеток-предшественниц различной степени дифференцировки, в том числе и из стволовых клеток. Эти недавно открытые свойства КМ-МСК мини пигов требуют дальнейшего изучения, поскольку они открывают новые возможности и ограничения манипуляций с ними.

МАТРИКСЫ ИЗ ФИБРОИНА, СШИТОГО ДЖЕНИПИНОМ, ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ПОЛУЧЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА IN VITRO

М.Г. Дроздова¹, В.Н. Бирюкова¹, Н.А. Сажнев², Н.Р. Кильдеева², Е.А. Марквичева¹

¹ ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБОУН ВО Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, Россия

e-mail: drozdovamg@gmail.com

Ключевые слова: тканевая инженерия, фиброин, дженипин, фибробласты L929, мезенхимальные стволовые клетки.

Фиброин (Фб) — перспективный материал для тканевой инженерии (ТИ), благодаря хорошим механическим свойствам, биосовместимости и биоразлагаемости. Однако матриксы из регенерированного Фб водорастворимы. Использование химической сшивки для предотвращения растворимости Фб может оказаться неэффективным из-за низкого содержания первичных аминогрупп в его структуре. Поскольку растворимость Фб зависит от конформационного состояния: водорастворимые α -спирали и нерастворимые β -складчатые структуры, создание условий для конформационного перехода $\alpha \rightarrow \beta$ при образовании гидрогеля из Фб позволяет влиять на его растворимость.

Целью исследования было получение матриксов на основе Фб, сшитого дженипином (Дж), и изучение их структуры, физико-химических свойств, а также оценка биосовместимости *in vitro*.

Для получения пористых матриксов растворы Фб (20 и 30 масс. %) замораживали при -10°C и лиофилизовали. Полученные матриксы сшивали инкубацией в растворе Дж (10 масс. %) в этаноле в течение 24 часов. С помощью конфокальной лазерной микроскопии (КЛМ) было показано, что матриксы образуют систему с открытыми порами средним размером 149 ± 7 мкм и 355 ± 14 мкм для матриксов Фб-20 (20 масс.%) и Фб-30 (30 масс.%) соответственно. Отсутствие растворимости обеспечивалось как переводом Фб в β -конформацию, так и химической сшивкой Дж в спиртовой среде.

Цитотоксичность Фб матриксов изучали с помощью экстракт теста с использованием мышинных фибробластов L929 в качестве модельных клеток. Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ. После инкубации клеток в неразбавленных экстрактах происходило некоторое снижение их жизнеспособности, однако изменений в морфологии не наблюдали. После разбавления экстрактов жизнеспособность клеток повышалась. Распределение и морфологию клеток L929 и иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток человека (hTERT-MSC) оценивали с помощью КЛМ через 7 дней культивирования в матриксах. Для этого клетки окрашивали витальным красителем Кальцеин АМ. Клетки сохраняли жизнеспособность, имели характерную веретенообразную морфологию и образовывали плотный клеточный монослой на матриксах Фб. Таким образом, макропористые матриксы Фб являются перспективными для ТИ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00261).

КЛЕТочная МОДЕль для ИЗУчЕНИЯ МОЛЕКУлярно-ГЕНЕТИчЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ с МУТАЦИЕЙ в ГЕНЕ GBA

Е.С. Дроздова^{1,2}, Е.В. Григорьева², С.В. Павлова², С.П. Медведев², Д.А. Сорогина^{1,2}, А.Е. Копытова³, Г.В. Байдакова⁴, Е.Ю. Захарова⁴, С.Н. Пчелина³, С.М. Закаян²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра Курчатовский институт, Гатчина, Россия

⁴ ФГБНУ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

e-mail: e.drozdova2@ngs.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, дофаминергические нейроны, глюкоцереброзидаза, мутация p.N370S, амброксол.

Вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием является болезнь Паркинсона (БП) — хроническая патология, поражающая дофаминергические (ДА) нейроны черной субстанции. Одна из причин развития БП — мутации в гене *GBA*, которые приводят к снижению уровня мРНК *GBA* и белка глюкоцереброзидазы (GCase). Снижение активности GCase приводит к накоплению липидного продукта метаболизма, способствующего формированию нейротоксичных агрегатов белка α -синуклеина.

Для изучения механизмов мультифакторных заболеваний и поиска способов их лечения необходимо создавать адекватные модели, что является достаточно нетривиальной задачей, особенно в случае нейродегенеративных патологий: работа с образцами клеток мозга пациентов лимитирована постмортальными материалами, а использование животных моделей для тестирования новых лекарственных препаратов ограничивается из-за различий в метаболизме ксенобиотиков. Решением данных проблем стали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), способные

неограниченное время жить в культуре и дифференцироваться в релевантные типы клеток.

Технологией репрограммирования мононуклеарных клеток двух пациентов с *GBA*-ассоциированной формой БП (мутация p.N370S) и двух потенциально здоровых доноров получены линии ИПСК, проведена их характеристика (кариотипирование, иммунофлуоресцентный анализ и кПЦР на экспрессию маркеров плюрипотентности, тест на спонтанную дифференцировку) [1]. Путем направленной дифференцировки ИПСК получены культуры дофаминергических нейронов, экспрессирующих специфические маркеры (TH, LMX1A).

Проведено тестирование полученной культуры: оценен уровень экспрессии гена *GBA* и удельной активности GCase. Относительно здорового контроля оба показателя снижены, что соответствует литературным данным [2].

В полученных нейронах наблюдается повышение активности фермента GCase в ответ на действие амброксола, который, согласно литературе, специфически связывается с белком и стабилизирует его конформацию. Амброксол — известное муколитическое средство — сейчас находится на стадии клинических испытаний в качестве лекарственного препарата для БП [3]. Наблюдаемый ответ культуры на действие препарата говорит об адекватности полученной модели.

Таким образом, в ходе работы получена перспективная клеточная модель, которая воспроизводит молекулярный фенотип мутации, вызывающей развитие БП, а также показано, что культура пригодна для поиска способов фармакотерапии данной патологии. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-20063.

Литература:

1. Grigor'eva E. V., Drozdova E.S., Sorogina D.A. et al. *Stem Cell Research*. 2022. V. 59. P. 102651.
2. Sanchez-Martinez A., Beavan M., Gegg M.E. et al. *Scientific Reports*. 2016. V. 6. P. 31380.
3. Mullin S., Smith L., Lee K. et al. *JAMA Neurology*. 2020. V. 77. P. 427–434.

ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ БИОИСКУССТВЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

А.Д. Дубко, А.В. Свирская, М.Ю. Юркевич, Д.Б. Нижегородова, М.М. Зафранская

УО Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

e-mail: dubko.immun@gmail.com

Ключевые слова: скаффолд, рецеллюляризация, ко-культура, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, тканеинженерная конструкция.

Разработка функционально состоятельных тканеинженерных конструкций печени (ТИК) обладает высоким практическим потенциалом и является перспективной научной платформой для исследований фармакологического, биоинформационного, клинического профилей, расширяет возможности для изучения межклеточного взаимодействия в ткани печени, оценки механизмов деактивации ксенобиотиков и действие их на метаболические пути.

Для сборки ТИК использованы изолированные доли скаффолда печени крысы (n=4) объемом от 0,66 до 4,38 см³, полученные путем перфузионной

децеллюляризации [1]. Рецеллюляризацию образцов скаффолда проводили инъекционным способом в два этапа: сначала формировали подложку из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (2,5×10⁵ кл/см³), затем через 24 часа вводили ко-культуру гепатоцитов и перитонеальных макрофагов (соотношение 3:1) в концентрации 3,25×10⁶ кл/см³. Клеточные потери после рецеллюляризации вследствие выхода через капсулу скаффолда составили 18,3±0,9%. Собранные ТИК культивировали течение 9 суток при 37 °С и 5% CO₂. Для поддержания собранных ТИК в жизнеспособном состоянии разработана перфузионная система, обеспечивающая равномерное распределения питательной среды.

Оценку функциональной состоятельности ТИК проводили по синтезу альбумина и мочевины на 1, 3, 6, 9 сутки. На 1 сутки культивирования ТИК обладали максимальной синтезирующей активностью: продукция альбумина составила 24,6±0,14 мг/млн кл/сут, что в 15,4 раза больше, чем в монослойной ко-культуре (1,6±0,3 мг/млн кл/сут), мочевины — 8,65±0,11 мкг/млн кл/сут. Однако, во всех образцах в период с 1 по 9 сутки культивирования наблюдалось стойкое снижение синтезирующей активности. Так, на 9 сутки продукция альбумина составила 4,6 мг/млн кл/сут, мочевины — 1,38±0,21 мкг/млн кл/сут.

Таким образом, собранные ТИК обладали способностью продуцировать альбумин и мочевину на протяжении 9 суток с тенденцией постепенного снижения синтетической активности. Дальнейшая работа сконцентрирована по трем направлениям: разработка целлюлярных функционально состоятельных конструкций, обладающих высоким самоподдерживающим и регенеративным потенциалом; изучение и модификация метаболического потенциала ТИК; модернизация перфузионной системы обеспечения и длительной поддержки ТИК с целью создания условий культивирования максимально приближенных к физиологическим. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № M19APM-O16 от 02.05.2019.

Литература:

1. Дубко А.Д., Юркевич М.Ю., Лобай М.В. и др. Докл. НАН РБ, 2021. Т.65. № 4. С. 461–468.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ФОРМИРОВАНИЮ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

А.Б. Дымников¹, Е.А. Гостева²

¹ *Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

² *Кафедра материаловедения полупроводников и диэлектриков, Национальный исследовательский технологический университет МИСиС, Москва, Россия*

e-mail: dymnikov_ab@pfur.ru

Ключевые слова: дентальные имплантаты, остеоинтеграция, поверхность дентального имплантата, технологии обработки поверхности, стволовые клетки.

Основным материалом для изготовления дентальных имплантатов исторически является титан [3]. Всем известные качества титана, такие как биоинертность и высокая биосовместимость, коррозионная стойкость, низкая теплопроводность, немагнитность обуславливают его выбор в качестве материала для изготовления дентальных имплантатов.

Современные принципы дентальной имплантации базируются на фундаментальных исследованиях 60–70-х годов американского дантиста Leonard I. Linkow [5] и профессора анатомии Гетеборгского университета Per-Ingvar Branemark [4, 2, 1], в ходе которых был описан процесс остеоинтеграции и сформулированы основные принципы взаимодействия титана с костью и факторы, влияющие на процесс остеоинтеграции.

В основе феномена остеоинтеграции лежат процессы, происходящие на клеточно-молекулярном уровне, поэтому большое внимание уделяется исследованиям химического состава и микроструктуры поверхности титана, а также методов и способов ее обработки и модификации с целью придания остеоинтегративного потенциала.

В данной работе мы при помощи электронной микроскопии оценили микроструктуру поверхности дентальных имплантатов различных систем, представленных на отечественном рынке, провели микрорентгеноспектральный анализ основного материала имплантатов и сравнили основные методики обработки поверхности современных имплантатов. На основе имеющихся экспериментальных данных по формированию нанорельефа поверхности предложена новая технология обработки дентальных имплантатов, готовая к промышленному применению. Проведена оценка адгезии створчатых клеток к наномодифицированным поверхностям.

Литература:

1. А.А. Куликова, А.Б. Дымников, С.Ю. Иванов [и др.] Клиническая стоматология. — 2021. — Т. 24. — № 3. — С. 52–58.
2. А.А. Куликова, А.Б. Дымников, С.Ю. Иванов [и др.] Клиническая стоматология. — 2021. — Т. 24. — № 2. — С. 72–76.
3. Л.Е. Разбицкая, Е.А. Гостева, А.Б. Дымников Международная научно-практическая конференции им. Д.И. Менделеева, посвященная 90-летию профессора Р.З. Магарила : Материалы конференции, Тюмень, 25–27 ноября 2021 года
4. Brånemark PI. J Prosthet Dent. 1983 Sep;50(3): 399–410.
5. Linkow LI. Dent. Surv. 1971 Sep; 47(9): 32–3.

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

К.С. Дырина¹, Р.А. Абрамович², Р.Д. Вырщиков³, О.Г. Потанина², Ю.А. Фомина³, Н.Б. Шестопалова³, Т.Ю. Калюта³, А.С. Федонников³

¹ ООО «Биннофарм Групп», Москва, Россия

² Научно-производственный участок Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ

им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

e-mail: solnyshko1809@mail.ru

Ключевые слова: Авран лекарственный, перспективное ЛРС, кукурбитацин, алкалоиды, флавоноиды, химический состав, противоопухолевая активность.

Несмотря на широкое развитие производства лекарственных препаратов, биологически активные соединения растительного происхождения продолжают занимать значительное место в современной медицине.

Одним из ценных видов перспективного лекарственного растительного сырья является Авран лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) — травянистое растение,

относящееся к семейству Норичниковых, ранее использовался в научной медицине с 1968 года (ФС 42-2358-85) в составе сбора по прописи Здренко. Кроме того, авран лекарственный входит в Фармакопею Франции десятого издания. Авран лекарственный входит в группу малоизученных растений, так как недостаточно информации о его химическом составе, фармакологическом действии, отсутствуют методы стандартизации. Все это диктует необходимость фармакогностического исследования сырья Аврана лекарственного и разработки нормативной документации для него [1].

Авран лекарственный широко распространён в Евразии и Северной Америке и хорошо известен в народной медицине. В траве Аврана лекарственного найдены биологически активные вещества, имеющие широкий спектр лечебного действия на организм человека, включая противотуберкулезное и антиопухолевое, а также спазмолитический, антимикробный и антиоксидантный эффекты. Кроме того, из листьев Аврана Лекарственного получают средства с антикахецическими и иммуномодулирующими свойствами. По данным изученных нами научных источников, большие перспективы разработки противоопухолевых препаратов нового поколения связаны с биофлавоноидами. Авторы полагают, что в связи с широким спектром действия биофлавоноидов, содержащимися в данном растении, потенциально возможно, на их основе разработать новые безопасные противоопухолевые средства. Наряду с флавоноидами авран лекарственный содержит не менее перспективные вещества в плане разработки лекарственных препаратов — тетрациклические тритерпеноиды, включая кукурбитацин, которые обладают широким спектром фармакологических эффектов (противоопухолевое, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное действие против вируса гепатита В (HBV), ингибирование репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и антидепрессивные действия). В настоящее время имеются многочисленные сведения по экспериментальным фармакологическим исследованиям кукурбитацина, подтверждающие его ценность. Кроме того, состав аврана лекарственного привлекает внимание ученых содержащимися в нем алкалоидами, к сожалению, до сих пор еще не установленной структуры, но проявляющими значительную активность и, прежде всего, как противоопухолевые средства [2].

В народной медицине спиртовая настойка Аврана Лекарственного используется для лечения асцита, гнезом которого является сердечная недостаточность, при этом действующими веществами, обуславливающими терапевтический эффект, по данным проведенных исследований считают кукурбитацин и элатеризид [4].

Имеются сведения по результатам проведенных доклинических исследований, где были использованы неопухолевые эпителиальные клетки клеточной культуры почки эмбриона свиньи SPEV и опухолевые клетки рака шейки матки человека HeLa. При суточном воздействии экстракта аврана лекарственного на клетки SPEV наблюдался цитостатический эффект при подавлении пролиферативной активности неопухолевых клеток, при этом не вызывая их гибель. Что касается опухолевых клеток HeLa, то экстракт в малых дозах снижал концентрацию СКК и замещал опухолевую ткань соединительной. Полученные данные свидетельствовали о том, что опухолевые клетки наиболее чувствительны к экстракту Аврана лекарственного [3].

Данные по химическому составу аврана лекарственного разрозненны, в некоторых случаях противоречивы, что требует дополнительных исследований и их систематизации.

В связи с этим, изучение фитохимического состава и фармакологической активности аврана лекарственного является актуальной проблемой, в первую очередь как перспективного противоопухолевого лекарственного средства с целью дальнейшей разработки на его основе различных лекарственных форм.

Содержащиеся в Авране лекарственном биологически активные вещества, перспективны для дальнейшего изучения, с последующей разработкой новых лекарственных средств. Важным является вопрос максимального извлечения БАВ из растения, их стандартизация, разработка технологии и состава удобных для применения лекарственных форм, способствующих проявлению всех полезных свойств травы аврана лекарственного.

Литература:

1. В.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. — М. МЕДпресс-информ, 2011. — 144 с.
2. Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова, [и др.] Злокачественные опухоли. — 2017. — Т.7, № 3. — С. 133–134.
3. Отчет по оценке результатов доклинических исследований экстракта аврана лекарственного и основных его активных компонентов.
4. Fisher, D.E. Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 539–542.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ МСК ПЕРЕКЛЮЧАЮТ ФЕНОТИП МАКРОФАГОВ С ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО НА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ

У.Д. Дьячкова¹, М.А. Виговский^{1,2}, Н.А. Басалова², О.А. Григорьева², А.Ю. Ефименко^{1,2}

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

² Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: dyachkovauliana@gmail.com

Ключевые слова: макрофаги, внеклеточные везикулы, мезенхимные стромальные/стволовые клетки, воспаление.

Воспаление — это защитный механизм, запуск которого происходит одним из первых при повреждении тканей. В развитии воспалительных реакций важную роль играют макрофаги. В норме происходит их поляризация в провоспалительный фенотип (M1-классически активированные) для привлечения иммунных клеток и их активации, а затем переключение на противовоспалительный (M2-альтернативно активированные), что приводит к разрешению воспаления. Однако, в определенных условиях воспаление может приобрести характер хронического, что сопровождается избыточной секрецией цитокинов и других биологически активных молекул, которые приводят к развитию и прогрессированию фиброза. Сегодня перспективным терапевтическим подходом к лечению фиброза является использование мезенхимных стромальных клеток (МСК) и их секретомы. Показано, что в составе внеклеточных везикул, продуцируемых МСК (ВВ-МСК), окружающим клеткам могут передаваться специфические некодирующие микроРНК, хотя механизм их влияния на макрофаги и воспаление в целом остается малоизученным. Поэтому целью нашей работы стало изучение влияния ВВ-МСК на поляризацию макрофагов и возможные механизмы их действия. Для этого мы выделяли моноциты из периферической крови человека и стимулировали их дифференцировку в макрофаги с помощью GM-CSF. После этого мы добавляли LPS в комбинации с IFN γ для

поляризации в M1-тип, IL-4 — в M2a-тип либо ВВ-МСК жировой ткани человека, а после этого анализировали уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных факторов. С помощью ПЦР анализа мы показали, что действие ВВ-МСК, сходно с влиянием IL-4, стимулирует экспрессию генов-маркеров M2a-макрофагов (CD200R1). При этом снижается экспрессия генов-маркеров M1-макрофагов (IL-6, CD86, IL-1b, CCR7, TNF α , COX2), увеличение которых происходит под действием LPS+IFN γ . С помощью таргетного ПЦР-анализа микроРНК мы показали, что ВВ-МСК содержат микроРНК 27a-3p. Данная микроРНК, по данным литературы, подавляет сигнальный каскад GM-CSF, LPS или IFN γ , снижая транскрипцию своей мишени NF κ B1, ингибируя поляризацию в M1-тип. Таким образом, ВВ-МСК способны переключать фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный, в том числе за счет переноса специфических некодирующих микроРНК, механизм действия которых требует дальнейших исследований. Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-29-04172.

БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА АОРТЫ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЛИКОКАЛИКСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

П.Е. Евстигнеева¹, В.Е. Успенский², И.В. Воронкина¹

¹ ФГБНУ ИЭМ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: adamova.polina@gmail.com

Ключевые слова: атеросклероз, аорта, гликокаликс, внеклеточный матрикс, атеросклеротическая бляшка, аневризма аорты.

Сердечно-сосудистые заболевания, причиной и началом которых часто является атеросклероз (АС), являются самой распространенной причиной смерти в развитых странах. Для разработки стратегий лечения и профилактики АС необходимо понимание биохимических механизмов, лежащих в основе данного патологического процесса.

В последнее время исследователи обратили внимание на роль внеклеточного матрикса (ВКМ) и эндотелиального гликокаликса в патофизиологии АС [1]. Установлено, что раннее интимальное утолщение стенки сосудов сопровождается накоплением в них версикана, который становится маркером начального развития АС и причиной рестенозов после ангиопластики [2]. Также известно изучение содержания в бляшках хондроитинсульфата, гепарансульфата и декорина, который локализуется в местах их кальцификации [3]. Содержание перлекана при АС снижено по сравнению с нормой [4]. В найденных работах авторы в основном проводили гистологическое изучение материала. Результаты разных исследований часто противоречивы.

В представленной работе был проведен биохимический анализ интраоперационно полученного материала: тканей нормальных и измененных (аневризма) аорт и атеросклеротических бляшек. Определяли такие компоненты ВКМ, как коллагены 1 и 4 типа, эластин, ламинин, и протеогликаны (ПГ) версикан, декорин, бигликан, перлекан, а также анализировали уровни активности MMP-9, -2 и -1. Образцы гомогенизировали и анализировали супернатант, содержащий растворимую часть

ВКМ, и осадок. Полученные результаты показали, что в супернатанте обнаружен версикан в небольших количествах и нет бигликана и перлекана. В ткани идентифицированы все компоненты ВКМ. Содержание версикана и бигликана в ткани условно нормальной аорты было существенно больше, чем в бляшке. В гомогенате ткани аневризматически расширенной аорты присутствовали практически все исследуемые компоненты, исключая ламинин. Растворимой формы декорина в бляшках обнаружено больше, чем в нормальной аорте, однако в гомогенатах этих же образцов его содержание примерно одинаково. В бляшке повышена также активность ММП-9 по сравнению с нормальной аортой. Гистологический анализ материала в этом исследовании не проводили.

Полученные нами предварительные данные подтверждают имеющиеся литературные и являются началом для дальнейшего исследования механизмов участия белков и ПГ ВКМ и эндотелиального гликокаликса в патогенезе АС, что, в свою очередь, может быть полезным в разработке лечения.

Литература:

1. Gialeli, C., Shami, A., Gonçalves, I. Current Opinion in Lipidology. 2021. V. 32. № 5 p 277
2. Максименко А.В., Турашев А.Д. Биоорганическая химия. 2014. V. 40. № 3. с. 259–274.
3. Fischer J.W., Steitz S.A., Johnson P.Y., et al. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004. V. 24. № 12. P. 2391–2396.
4. Tran, P. K., Agardh, H. E., Tran-Lundmark et al. Atherosclerosis. 2007. V. 190 № 2, p. 264–270.

КОНСЕРВАТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ЛИЦА ПОСЛЕ УКУСОВ ЖИВОТНЫХ

З.А. Евсюкова

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

e-mail: zoya.evsyukova@gmail.com

Ключевые слова: рваная рана лица, регенерация кожи, лечение ран, реконструкция лица, укус собаки, факторы роста, профилактика рубцов.

Собака, как говорится, — друг человека, а вот человек собаке друг не всегда, ибо подавляющее количество нападений собак на человека провоцируется им самим. Согласно данным Росздравнадзора, в 2021 году с укусами животных в ЛПУ обратилось около 400 тыс чел, 70% всех укусов были нанесены собаками. Укусы собак являются серьезной медико-социальной проблемой, поскольку требуют мультикомплексного экстренного подхода в лечении пациента, что не всегда представляется возможным. Укушенная рана, нанесенная собакой, сама по себе является фактором риска бешенства, столбняка, а также гнойного расплавления тканей, поскольку микрофлора полости рта собак содержит специфические виды бактерий, которые могут быть резистентны к классическим антибиотикам. Другим важным моментом является факт того, что формирующиеся рубцы после завершения лечения становятся зачастую выраженным психотравмирующим фактором для пострадавшего.

Данный доклад является своеобразным протоколом ведения укушенных ран лица, основанном на принципах регенеративной медицины. В нем рассматриваются все

доступные практикующим специалистам методы, включая препараты и технологии, которые значительно улучшают результаты лечения данного вида ран. Приведены собственные клинические случаи, на примерах которых разобраны протоколы их лечения.

Доклад будет полезен всем врачам, работающим с ранами и рубцами, а также специалистам, которые занимаются эстетической медициной, т.к. протоколы ведения укушенных ран, основанные на принципах регенеративной медицины, являются эффективными, значительно улучшая результаты лечения, что отражается не только на функции мягких тканей лица, но и на психическом здоровье пациента.

СКАФФОЛД КАК ИСКУССТВЕННАЯ НИША ДЛЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, И.И. Кобякова, М.Л. Бугрова, Д.Д. Линькова

ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

e-mail: egorihina.marfa@yandex.ru

Ключевые слова: скаффолд, гидрогель, биополимеры, фибриноген, коллаген, мезенхимальные стволовые клетки, структура.

Активность клеточных процессов стволовых клеток регулируется внутренними и внешними сигналами клеточной ниши. В целом нишу стволовых клеток можно представить как микроокружение клеток, предоставляющее комплекс сигналов химических факторов, факторов роста и биофизических сигналов, которые определяют свойства стволовых клеток. В то же время концепция «ниши» предполагает обратную связь. Клетки способны моделировать свое микроокружение, поддерживая гомеостаз либо ремоделируя состав и структуру внеклеточного матрикса. Для обеспечения регенеративного потенциала продуктов тканевой инженерии при разработке носителей клеток, скаффолдов и тканеинженерных конструкций необходимо учитывать концепцию «ниши». В работе рассматривается с точки зрения искусственной клеточной ниши для мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, оригинальный гидрогелевый биополимерный скаффолд на основе криопреципитата плазмы крови и коллагена.

Материалы и методы. Для формирования скаффолда (Пат.№ 2653434) использовали криопреципитат плазмы крови и коллаген. Клеточный материал — МСК жировой ткани человека. Исследование структуры скаффолдов — сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия. Исследование пассивной и активной биодеградации проведено с использованием рефрактометрии. Для контроля за ростом клеток использовали методы световой, фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Оценивали пролиферативную активность и жизнеспособность (Пат. 2675376). Секреторную активность клеток оценивали с использованием ИФА.

Скаффолд обеспечивает адгезию клеток, активный клеточный рост и пролиферативную активность. Клетки, культивируемые в скаффолде, отличаются развитым цитоскелетом, образуют межклеточные контакты и формируют клеточную сеть. МСК, культивируемые в скаффолде, меняют свое микроокружение, секретируя VEGF-A и ремоделируя структуру скаффолда. Были оценены процессы

биodeградации скаффолдов, после культивирования их в течение 24 часов и 6 суток. Обнаруженные различия подтвердили изменения свойств скаффолдов, ремоделируемых клетками в процессе культивирования. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что процессы, происходившие при культивировании скаффолда, были сходны с естественными процессами «динамической взаимности». Это позволяет рассматривать представленный скаффолд в качестве искусственной ниши клеток. Представленный в работе комплексный подход может быть использован и для характеристики других скаффолдов с позиции концепции искусственной ниши клеток. Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках гос задания № 121022500010-6 (ЕГИСУ).

РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ В ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЕНОТИПА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

М.И. Ездакова¹, Д.К. Матвеева¹,
С.В. Буравков², Е.Р. Андреева¹

¹ Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

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

e-mail: andreeva_er@mail.ru

Ключевые слова: Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, щелевые контакты, ингибиторы, фенотипическая поляризация.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в физиологическом и репаративном ремоделировании тканей [1, 2]. Периваскулярная ниша — одно из наиболее известных локальных депо МСК. Ранее мы показали, что субэндотелиальные МСК формируют в этих локусах общую сеть [3]. В сосудистой стенке *in situ* в месте контакта МСК-МСК экспрессируется белок щелевых контактов (ЩК) Сх43, что предполагает возможность прямой межклеточной коммуникации. Наличие такой интегрированной системы обеспечивает, по-видимому, поддержание «покоящегося» (steady-state) фенотипа МСК. Нарушение целостности сети может вести к утрате гомотипических контактов и фенотипической поляризации с образованием «активированного фенотипа» МСК.

Мы оценили, как ингибирование гомотипических ЩК может влиять на свойства МСК, востребованные в ремоделировании тканей: внутриклеточные компартменты, паракринную, в частности ангиогенную активность, способность к миграции и фагоцитозу. В митотически неактивных МСК коммуникацию через ЩК подавляли с помощью специфического ингибитора — карбеноксолона. С помощью проточной цитофлуориметрии в МСК с заблокированными ЩК было показано двукратное увеличение массы митохондрий. Трансмембранный потенциал митохондрий и уровень АФК, а также активность лизосомального компартмента при этом не изменялись. МСК с заблокированными ЩК менее активно мигрировали в модели «раны». Способность к фагоцитозу частиц латекса была снижена. В кондиционированной среде (КС) от МСК с заблокированными ЩК был достоверно ниже уровень плейотропных IL-6, IL-8, MCP-3. Эта КС не стимулировала ненаправленную миграцию эндотелиальных клеток и рост основных сосудов в хориоаллантоисной оболочке эмбриона перепела.

Сделано предположение, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК-МСК *in vivo* может негативно отразиться как на функционировании стромальных предшественников в местах их расположения, так и на возможности их мобилизации из тканевых депо. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00075.

Литература:

1. Nimiritsky P.P., Ereminchev R.Y., Alexandrushkina N.A. et al. Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 4. P. 823.
2. Rodríguez-Fuentes D.E., Fernández-Garza L.E., Samia-Meza J.A. et al. Arch. Med. Res. 2021. V. 52. № 1. P. 3.
3. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Bobryshev Y.V. Tissue Cell. 2016. V. 48. № 1. P. 25.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПОКРЫТЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА Fe₃O₄ ДЛЯ МЕЧЕНИЯ КЛЕТОК И ПОСЛЕДУЮЩЕГО ИХ ОТСЛЕЖИВАНИЯ IN VIVO МЕТОДОМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ

Н.И. Енукашвили^{1,2,3}, И.Е. Коткас², В.В. Багаева³,
Д.С. Боголюбов¹, А.Ю. Бородин⁴, Д.С. Никитенко⁵,
Г.С. Яцемирский³, А.Ю. Артамонов⁶,
И.В. Миндукшев⁷, О.В. Супильникова^{2,3},
И.И. Масленникова^{2,3}, Е.М. Приходько³

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
Россия

² ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,
Россия

³ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург,
Россия

⁴ АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
пос. Кузьмолловский, Россия

⁵ ООО «Ветеринарная клиника неврологии,
травматологии и интенсивной терапии», Санкт-Петербург,
Россия

⁶ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,
Россия

⁷ ФГБУН Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург,
Россия

e-mail: nienukashvili@mail.ru

Ключевые слова: магнетит, наночастицы оксида железа, биораспределение, наночастицы, получаемые методом электрического взрыва проволоки, мезенхимные стромальные клетки, фибробласты.

При использовании многих клеточных технологий необходимым условием является верификация присутствия трансплантированных клеток в месте инъекции и отсутствия их миграции за его пределы. Существующие методы (биопись, оптический имиджинг и т.д.) не всегда соответствуют запросам исследователей и клиницистов. Предложено использовать метод магнитно-резонансной томографии (МРТ) для отслеживания трансплантированных клеток, меченных наночастицами контрастирующего вещества (чаще всего — оксидов железа Fe₃O₄ и Fe₂O₃). Около 92% наночастиц оксидов железа получают химическими и только 6% — физическими методами. При этом наночастицы, полученные физическими методами, могут быть наработаны в больших количествах и содержат меньше токсичных примесей. Цель работы: оценка возможности использования полученных электровзрывным методом магнитных наночастиц (80–120 мкм) Fe₃O₄

(магнетита) без органического покрытия с целью их детекции *in vivo* методом МРТ в организме реципиента. Оценка размера и формы частиц проводили методами динамического светорассеяния, лазерной дифракции и электронной микроскопии. Показано, что форма частиц близка к сферической (16–136 нм). Фибробласты и мезенхимные стромальные клетки (МСК) поглощали наночастицы, добавленные в культуральную среду в диапазоне концентраций 50–300 мкг/мл, без снижения жизнеспособности и изменения набора поверхностных маркеров согласно результатам проточной цитометрии. Методами просвечивающей электронной микроскопии и иммуноцитохимического окрашивания показано, что через 24 часа наночастицы присутствуют во внутриклеточных мембранных везикулах, большинство из которых являются эндосомами и аутофагосомами. Для оценки миграции трансплантированных меченых аллогенных фибробластов и МСК человека, крысы и карликовой свиньи в тканях *post mortem* и *in vivo* и использовали метод МРТ на сканерах 1 и 1,5Т. В экспериментах *in vivo* клетки, иммобилизованные в гелевом носителе, вводили подкожно и внутримышечно крысам, а также подкожно карликовым свиньям, далее сканировали область инъекции через 24 и 120 часов. После сканирования вырезали область инъекции и прилегающие ткани и проводили гистохимический анализ с окраской по Перлсу для дополнительного контроля за частицами железа. В ходе МРТ-сканирования клетки, меченные наночастицами железа, регистрировали в месте введения в течение 120 часов после подкожного и внутримышечного введения у крыс, а также подкожного введения у карликовых свиней; миграции клеток в окружающие ткани не выявлено. Таким образом, метод МРТ может быть использован для верификации таргетной доставки клеток и отслеживания их миграции вблизи места введения. Для оценки пригодности метода для отслеживания миграции малого числа клеток на значительные расстояния необходимы дальнейшие исследования. Работа выполнена в рамках Государственного задания МЗ РФ № 05600068-22-00 (тема № 122012100079-7).

ЭФФЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ В СОСТАВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

А.А. Ергешов, Т.И. Абдуллин, М. Зухайб

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: mohamadzougheib@gmail.com

Ключевые слова: биоматериалы, гидрогели, переходные металлы, регенерация мягкой тканей, подкожная имплантация.

Разработка биоматериалов для эффективной регенерации мягких тканей при травматических и дегенеративных повреждениях является актуальной биомедицинской задачей. В контакте с поврежденными тканями биоматериалы служат матрицей для замещения дефекта и роста клеток. Введение активных компонентов в состав биоматериалов усиливает их способность стимулировать процессы жизнедеятельности клеток и регенерации тканей. Перспективным компонентом биоматериалов являются соединения переходных металлов (ПМ), участвующих в окислительно-восстановительных реакциях и выполняющих функцию кофактора ферментов. Регенеративные эффекты ПМ в составе гидрогелевых биоматериалов в настоящее время недостаточно изучены.

В работе получен ряд ПМ-содержащих макропористых гидрогелей (криогелей), формируемых в условиях криотропного желирования желатина в качестве модельного биополимера. Структуру полученных криогелей характеризовали микроскопическими методами. Оптимизирована *in vivo* модель, основанная на подкожной имплантации мембран криогелей на дорсальной поверхности у крыс. Морфологию имплантированных криогелей и окружающих тканей анализировали с использованием комплекса гистологических методов. Установлено, что введенные металлы: цинк, медь и кобальт повышают уровень экспрессии HIF-1 α в тканях кожи, что объясняется способностью ПМ вызывать сверхпродукцию АФК в клетках. Цинк и медь более эффективно индуцировали сверхэкспрессию матриксных металлопротеиназ MMP-1 и MMP-3 в коже, ускоряли деградацию имплантируемых биоматериалов, повышали рост дермы и выработку коллагена. Все исследуемые металлы обладали различной ангиогенной активностью, проявляющейся в формировании сосудистых структур и продукции эндотелиального фактора CD31 в разных слоях кожи. Ангиогенный эффект кобальта сопровождался усилением признаков воспалительного ответа в коже и появлением многоядерных гигантских клеток. Результаты выявляют ПМ в качестве потенциального биоактивного компонента гидрогелевых биоматериалов, модулирующего *in vivo* эффекты при имплантации, и они могут быть использованы при создании биоматериалов для регенерации мягких тканей. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Вьетнамской академии наук и технологий в рамках научного проекта № 21-515-54003» и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ

П.С. Еремин, Е.Ю. Костромина, П.А. Марков, И.Р. Гильмутдинова, Т.В. Кончугова

НМИЦ реабилитации и курортологии, Москва, Россия

e-mail: bioimed07@hotmail.com

Ключевые слова: жировая ткань, низкоинтенсивное лазерное излучение, стромально-васкулярная фракция.

Эффективность терапии с использованием аутологичных клеточных продуктов на основе жировой ткани (ЖТ), включая стромально-васкулярную фракцию (СВФ), показана при проведении реконструктивной хирургии, а также при лечении целого ряда заболеваний. При этом мезенхимальные стромальные клетки (МСК) ЖТ характеризуются невысокой скоростью пролиферации, особенно при получении материала от пожилых людей или пациентов с патологией [1]. Целью данной работы было изучение воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), применяемого в физиотерапии и реабилитации [2], на пролиферативную активность МСК ЖТ.

В качестве клинического материала использовали образцы ЖТ в форме липоасpirата, полученные от условно здоровых пациентов при липосакции в клинике пластической хирургии. Выделение клеток СВФ осуществляли ферментативным методом по описанной ранее

методике [3]. Суспензию клеток пассировали в 96-луночном планшете (5×10^5 кл./см²), культивировали до образования монослоя, после чего подвергали воздействию лазера с помощью аппарата «Лазмик-Влок» [4] с излучающей лазерной головкой (635 нм) в дозе от 0,02 до 4,0 Дж и наносили повреждение механическим способом. С использованием микроскопии осуществляли подсчет клеток и оценивали площадь поврежденного монослоя через 0, 24 и 48 ч после облучения.

Установлена зависимость динамики восстановления монослоя от параметров НИЛИ. Показано ингибирующее влияние высоких доз (4 Дж) НИЛИ красного спектра на восстановление монослоя через 24 и 48 ч. При дозах облучения 0,02–3,0 Дж красным лазером через 24 ч не было выявлено значимого изменения площади повреждения; через 48 ч отмечено значительное уменьшение площади повреждения (>50%) для доз 1,0–2,0 Дж по сравнению с контролем. Таким образом, показана эффективность и установлены диапазоны доз для применения НИЛИ с целью воздействия на пролиферативную активность клеток СВФ ЖТ, предназначенных для последующего клинического применения.

Литература:

1. Kostromina E., Eremin P.S., Kudryashova I.S. et. al. *Bull. Rehab. Med.* 2022. V. 21. P. 202–211.
2. Осипов А.Н., Владимиров Ю.А. Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. науч. трудов. Минск: БГУ. 2018. С. 5.
3. Гильмутдинова И.Р., Костромина Е.Ю., Веремеев А.В. и др. *Гены и Клетки.* 2021. Т. 16. № 3. С. 80–85.
4. С.В. Москвин, Т.В. Кончугова, А.А. Хадарцев. *Вопр. курортотол. физиотер. леч. физ. культ.* 2017. Т. 94. С. 10–17.

СОЗДАНИЕ МИКРОИНКАПСУЛИРУЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

П.С. Ермакова¹, А.Ю. Богомолова¹, Наралиев Н.У.¹, Д.М. Кучин^{1,2}, Е.А. Васильчикова¹, М.А. Батенькин³, С.А. Чесноков³, В.Е. Загайнов^{1,4}, Е.В. Загайнова^{1,5}, А.В. Кашина¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² ГБУЗ НО НОКБ им. Н.А. Семашко, Нижний Новгород, Россия

³ Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, Нижний Новгород, Россия

⁴ ГБУЗ НО Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород, Россия

⁵ Университет им. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

e-mail: bardina-polina@mail.ru

Ключевые слова: островок Лангерганса, инкапсуляция, микрокапсулы, альгинат, РМОТА.

Инкапсуляция островков Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы (ПЖ) является одним из перспективных решений для защиты ОЛ при лечении диабета первого типа. Микроинкапсулирующая система представляет собой биосовместимую матрицу, проницаемую для питательных веществ и инсулина и не проницаемую для компонентов иммунной системы. До сих пор не создано идеальной капсулы, соответствующей требованиям цитотоксичности, биосовместимости и проницаемости.

В данном исследовании была создана и протестирована новая инкапсулирующая система для островков Лангерганса на основе альгината и полимера (поли-[2-(метакрилоилокси)этил]триметиламмонийхлоридом (РМОТА)).

Синтез капсул производился микрофлюидным методом. Для инкапсуляции использовали ОЛ экспериментальных животных. ОЛ выделяли согласно стандартным методикам с собственными модификациями. Проницаемость капсул оценивалась путем инкубирования инкапсулированных ОЛ с FITC-мечеными лектинами различных молекулярных масс. Для анализа цитотоксичности микрокапсулы определяли жизнеспособность клеток до и после инкапсуляции с использованием окрашивания Live/Dead. Для оценки биосовместимости и скорости биодеградации микрокапсулы трансплантировали в ткани сальника крыс. Через 7 дней, оценивали количество вымытых капсул, их целостность, степень адгезии клеток и фиброзирования. Оставшиеся в тканях капсулы исследовали с использованием гистологического анализа.

Выявлено, что капсулы проницаемы для низкомолекулярных лектинов (36 и 75 кДа) и не проницаемы для высокомолекулярных лектинов (120 и 150 кДа), что позволяет инсулину проникать через мембрану и ограничивает антитела. Жизнеспособность ОЛ после инкапсуляции составила более 70 %. Целостность микрокапсул на основе альгината и РМОТА после вымывания составила более 80 %. Кроме того, большая часть вымытых капсул не была покрыта окружающими тканями, а гистологический анализ выявил незначительную иммунную реакцию и отсутствие фиброза вокруг капсул. Разработанная методика инкапсуляции островков Лангерганса и полученные данные могут быть использованы как основа для дальнейшей разработки технологии иммуноизолирующей микрокапсулы для лечения диабета первого типа. Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ (государственное задание № АААА-А20-120022590096-6).

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Е.Д. Жекибаев, О.И. Желтова, И.В. Меледина, Е.Я. Шевеля, Е.Р. Черных

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

e-mail: evgeniy.zhekibaev@bk.ru

Ключевые слова: цирроз печени, стромально-васкулярная фракция, мезенхимальные стромальные клетки.

На сегодняшний день трансплантация печени является единственным радикальным методом лечения пациентов с циррозом печени. Однако, данный метод имеет свои недостатки (длительное ожидание донора, продолжительная иммуносупрессивная терапия, высокая стоимость). Данные обстоятельства побуждают искать альтернативные методы лечения таких пациентов. В частности, метод использования клеточных технологий представляет большой интерес в связи со способностью мезенхимальных стромальных клеток выполнять функцию микроокружения для кровеносных стволовых клеток, дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки, оказывать стимулирующий эффект на регенерацию гепатоцитов и, оказывая супрессорную активность воспалительного процесса, препятствовать

дальнейшей прогрессии фиброза. Нами было инициировано поисковое научное исследование, целью которого стала оценка безопасности аутологичной трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК), полученных из жировой ткани (липоаспирата), в комплексном лечении больных циррозами печени (ЦП) различного генеза. Исследуемую группу составили 20 пациентов (7 мужчин и 13 женщин, средний возраст 53,5 года). Этиологические факторы цирроза представлены: вирусной (45%, В с дельта-агентом, $n=2$, и С, $n=7$) и невирусной этиологией (55%) ЦП. У 4 пациентов ЦП был обусловлен токсическим воздействием, у 5 — первичным билиарным циррозом, у 2 — криптогенным ЦП. В соответствии с классификацией ЦП по Child-Pugh пациенты распределились поровну в классах А (5–6 баллов) и В (7–8 баллов). Средний балл по шкале MELD составил 9,8. Всем пациентам была проведена липоаспирация (объём жировой ткани в среднем 100 мл) с последующим выделением стромально-васкулярной фракции и культивированием последней в стандартных условиях в течение 14 дней с целью получения МСК. Клинико-лабораторное обследование пациентов проводилось до начала терапии с мониторингом состояния больных через 6–12 мес. после окончания лечения. Всем пациентам однократно вводили аутологичные МСК (в среднем $12,94 \times 10^6$). Введение МСК хорошо переносилось пациентами и не сопровождалось развитием каких-либо побочных эффектов и серьезных нежелательных явлений. Из 12 пациентов, обследованных через 6–12 мес., половина пациентов (6 человек) ответили на проводимую терапию в виде уменьшения/ стабилизации балла по шкале MELD, у остальных балл по MELD увеличился. Ответившие пациенты не отличались от пациентов оппозитной группы ни по этиологии, ни по тяжести ЦП, в то же время были значимо старше (55,5 и 48 лет, $p < 0,05$). В настоящее время мониторинг пациентов продолжается. Полученные данные согласуются с имеющимися немногочисленными сообщениями [1] и позволяют сделать предварительный вывод о том, что применение МСК, полученных из клеток жировой ткани пациентов с циррозом печени различной этиологии, является безопасным и потенциально перспективным методом для стабилизации или улучшения функции печени.

Литература:

1. Sakai Y., Fukunishi S., Takamura M. et al. Regen Ther. 2021. V. 18. P. 97–101.

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА МАТРИСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO

И.В. Живодерников, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова

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

e-mail: kordait-2213@yandex.ru

Ключевые слова: микрогравитация, внеклеточный матрикс, мезенхимальные стромальные клетки.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются мультипотентными предшественниками клеток, участвующих в ремоделировании костной ткани и продуцирующих внеклеточный матрикс. Костная ткань претерпевает негативные изменения в условиях микрогравитации, и причиной таких изменений являются гравитационная чувствительность клеток. Целью данной

работы было изучить матрисом МСК при моделировании некоторых эффектов микрогравитации.

МСК из жировой ткани человека 3–5 пассажей после достижения монослоя разделялись на 2 группы: статический контроль и группа с моделированной микрогравитацией на random positioning machine (RPM). После 10-суточного воздействия для анализа молекул различных групп матрисома использовали методы гистологической окраски с помощью красителей Sirius Red и Fast Green, ПЦР в реальном времени, дот-блоттинга и мультиплексного анализа секретома.

Полуколичественная оценка продукции основных структурных белков корового матрисома выявила изменения в их содержании: снижение коллагеновых и повышение неколлагеновых компонентов ВКМ после экспозиции на RPM. Также повысилась экспрессия генов тенасцита (*TNC*) и тромбоспондинов (*THBS1*, *THBS2*, *THBS3*), что может провоцировать ослабление клеточной адгезии к матриксу и приводить к ухудшению минерализации и остеогенной дифференцировки МСК.

Анализ содержания протеаз ВКМ в кондиционированной среде МСК выявил повышение секреции металлопротеиназ (MMP-1, -2, -3) и катепсинов А, В, D при 10-суточном моделировании эффектов микрогравитации по сравнению со статическим контролем. При этом на транскрипционном уровне было продемонстрировано снижение экспрессии генов, кодирующих молекулы ингибиторов протеаз (*TIMP-1* и *TIMP-3*).

Исследование цитокинов и факторов роста в кондиционированной среде после 10-суточной экспозиции на RPM показало сдвиг секретома МСК в провоспалительный сектор: была повышена секреция провоспалительных цитокинов, таких как VEGF, IL-8, IL-12, $GR\alpha$ (CXCL1), MIG (CXCL9) и M-CSF (CSF-1).

Таким образом, моделирование эффектов микрогравитации вызывает активацию протеолитических процессов в МСК, снижение содержания коллагеновых белков в ВКМ МСК и повышение секреции провоспалительных цитокинов. В совокупности данные изменения могут обуславливать некоторые механизмы негативных изменений в костной ткани космонавтов во время космического полёта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ N 19-29-04026.

ДИНАМИЧЕСКАЯ РОЛЬ FOXP3 + TREG В РАЗВИТИИ СЕПСИСА ПРИ SARS-COV-2 И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ CAR-TREG В ПРОФИЛАКТИКЕ ОСЛОЖНЕНИЙ

О.А. Жукова¹, М.В. Бычинин¹, И.М. Калугин³, С.М. Юсубалиева⁴, Г.М. Юсубалиева^{1,2}

¹ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Первый МГМУ им. Сеченова, Москва, Россия

⁴ НАО Медицинский Университет «Астана», Нур-Султан, Казахстан

e-mail: oksana.saprikina82@mail.ru

Ключевые слова: коронавирусная инфекция (COVID-19), T-регуляторные клетки, сепсис.

Коронавирусная болезнь 2019 года (COVID-19) приводит к развитию тяжелой пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), полиорганной недостаточности, сепсиса и летального исхода. Регуляторные T-клетки (FOXP3⁺Tregs) играют важную роль в поддержании

иммунного гомеостаза и могут участвовать в подавлении воспаления, вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). В данном исследовании проводилась оценка FOXP3⁺ Treg у пациентов с COVID-19, выявление взаимосвязи между тяжестью заболевания, развитием сепсиса и изменением количества Treg. В настоящее время остается дискуссионным вопрос об изменении доли и абсолютного количества Tregs при инфицировании SARS-CoV-2.

Для исследования патофизиологических изменений, приводящих к развитию сепсиса при COVID-19 ретроспективно были проанализированы лабораторные биомаркеры острофазовых показателей (СРБ, ПКТ), показателей ОАК (лейкоцитов), цитокинов (IL-6), маркера риска образования тромбозов (Д-димер), витамина D, ранее существовавшим сопутствующим заболеваниями [гипертония, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, хронические заболевания легких, ожирение и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)]. Возраст, пол, расовая принадлежность и/или ранее существовавший иммунитет могут объяснять неоднородность пациентов с COVID-19 и влиять на исходы заболевания (Brodin P. 2021). Различия в статусе Treg могут быть связаны с гетерогенностью COVID-19. Так что имеет смысл сосредоточиться на смене FOXP3⁺ Tregs у больных COVID-19 различной степени тяжести. Пациенты проходили терапию в отделении интенсивной терапии (ОИТ) ФНКЦ ФМБА в период с апреля 2020 года по январь 2021 года (189 человек в возрастном диапазоне от 28 до 93 лет). FOXP3⁺ Tregs имеют решающее значение для поддержания иммунной толерантности (Sakaguchi S., 2008).

Среди умерших пациентов с COVID-19, поступивших в ОИТ, были значительно высокие уровни ПКТ, D-димера, СРБ, IL-6, лейкоцитов, наблюдался дефицит витамина D и выраженная лимфопения по сравнению с теми, кто выжил. Лимфопения со сниженным количеством CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток является очевидным симптомом у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Количество Т-клеток и CD4⁺CD25⁺аFOXP3⁺Treg отрицательно коррелировало с концентрацией ИЛ-6 в сыворотке/ Все пациенты на момент поступления в ОИТ имели повышенный прокальцитонин (ПКТ > 0,05 нг/мл), что говорит о вероятности развития сепсиса.

Основная стратегия в терапии с помощью CAR-Treg связана со способностью избирательно связываться с тканеспецифичными аутоантигенами (Zhang Q, Lu W, Liang CL, Chen Y, Liu H, Qiu F, et al. 2018). Было показано, что терапия CAR-Treg хорошо работает в различных доклинических моделях, включая ЭАЭ, колит и экспериментальную аллергическую астму (Blat D, 2014, Skuljec J, 2018, Chen W.A., 2020); при трансплантации почки (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04817774). Способность CAR-Treg вызывать иммунологическую толерантность обеспечивает их потенциальное применение в лечении SARS-CoV-2.

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПРЕПАРАТА — ГЕПАТОПРОТЕКТОРА И ОЦЕНКА ЕГО ЦИТОПРОТЕКТОРНЫХ И РЕГЕНЕРАТИВНЫХ СВОЙСТВ

Н.А. Забокрицкий

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия

e-mail: pharmusma@rambler.ru

Ключевые слова: биогепапротектор, гепатоциты, цитопротекторное действие, регенерация.

Основой нового гепатопротекторного препарата, обладающего полифункциональным механизмом действия, позволяющего эффективно восстанавливать угнетенные функции печени, с одновременной нормализацией иммунологических показателей, является входящий в его состав активный биокомпонент — пробиотические бактерии рода *Bacillus subtilis*, которые при введении в организм продуцируют комплекс БАВ (антибиотики, протеолитические, амилолитические и др. ферменты, иммуноглобулины, а также цитокины, интерлейкины, витамины, протеины, аминокислоты и другие активные вещества). Эти БАВ оказывают как местное, так и общее иммуномодулирующее действие, нормализуют клеточный и гуморальный иммунитет.

Целью работы являлось изучение защитного действия БАВ стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов *B. subtilis* ВКПМ В-9909 на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения. Работа проводилась с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41, позволяющая оценивать токсичность различных субстратов на культурах клеток и выдерживающая токсическое воздействие в разных концентрациях. На первом этапе исследований были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата (0,1%) и минимальная токсическая доза СС₄ по отношению к клеткам культуры Л-41 (500 мкг/мл¹). На следующем этапе было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *B. subtilis* В-9909 по отношению к клеткам линии Л-41. На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было показано цитопротекторное и регенеративное действие БАВ в составе фугата штамма *B. subtilis* В-9909 (выживаемость клеток составила 76% по сравнению с контролем). Результаты исследования пролиферативной активности через 96 ч показывают, что происходит выравнивание относительной предельной плотности культуры клеток Л-41 во всех пробах. Предельная плотность относительно контроля составила 1,04, 1,09 и 1,00, соответственно.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ в составе фугата штамма *B. subtilis* В-9909 не только обладают выраженным цитопротекторным действием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего и перспективного использования данного штамма в качестве биокомпонента нового гепатопротекторного регенеративного препарата.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации 122020900136-4.

КОМПОЗИЦИОННЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПОРИСТЫХ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МИКРОЧАСТИЦ

Ю.Д. Загоскин¹, Н.М. Кузнецов¹, А.С. Семкина^{1,2}, А.А. Захаревич¹, С.Н. Чвалун^{1,2}, Т.Е. Григорьев¹

¹ ФГБУ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

e-mail: kyz993@yandex.ru

Ключевые слова: гидрогели, хитозан, полилактид, пористые микрочастицы, композиционные материалы.

Как пористые полимерные материалы, так и гидрогели уже довольно давно представляют большой интерес в различных областях применения, в том числе в регенеративной

медицине. Однако такие изделия не лишены недостатков. Так гидрогелевые материалы либо имеют довольно низкие значения модуля упругости, либо, в случае большого количества сшивок, становятся хрупкими и не позволяют клеткам закрепляться и проникать внутрь материала. В свою очередь пористые полимерные материалы способствуют закреплению и пролиферации клеток и могут обладать различной, требуемой жесткостью, но неспособны к *in situ* моделированию, например, при костно-пластических операциях или в торакальной хирургии.

В работе предложено использование композиционных материалов из хорошо зарекомендовавших себя пористых микрочастиц полилактида [1] и гидрогелей хитозана [2]. Сочетание этих материалов позволяет нивелировать минусы описанные выше. Пористые частицы получали методом сублимационной сушки замороженной суспензии полилактида 1,4-диоксана. Средний диаметр частиц составил 80 мкм, средний размер пор — 10 мкм. В качестве сшивателей для гидрогелей использовали глутаровый альдегид и генипин. Установлено, что для данных материалов наиболее перспективным является генипин, в виду его химической инертности по отношению к наполнителю и, по данным литературы, меньшей токсичностью по сравнению с глутаровым альдегидом.

Наполнение гидрогелей хитозана пористыми микрочастицами приводит к заметному увеличению модуля упругости материалов и переходу от эластичного к упругому поведению композиционных материалов. В зависимости от количества наполнителя можно изменять модуль упругости материалов вплоть до ~1 МПа, при наполнении 20 масс.%, что на два порядка выше по сравнению с ненаполненными гидрогелями. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-4935.2022.1.3, соглашение № 075-15-2022-421).

Литература:

1. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B. et al. *Polymers*. 2021. V. 13, № 22. P. 3974.
2. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B. et al. *Molecules*. 2021. V. 26, № 2. P. 261.

ВЫСОКОПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИЛАКТИДА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА С ЭФФЕКТОМ ПАМЯТИ ФОРМЫ

Ю.Д. Загоскин¹, А.А. Захаревич¹,
Ю.С. Фомина¹, С.Н. Чвалун^{1,2}, М.М. Алексанян³,
С.А. Макаров³, Т.Е. Григорьев¹

¹ ФГБУ НИЦ Курчатowski институт, Москва, Россия

² ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

³ ФГБНУ Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: zagos@inbox.ru

Ключевые слова: высокопористые материалы, губчатые изделия, полилактид, поликапролактон, память формы, имплантаты.

В области регенеративной медицины одной из важных задач является создание искусственного природоподобного матрикса. Биосовместимые полимерные губчатые материалы все больше привлекают интерес ввиду наиболее близкой архитектуры к эталонным децеллюлизованным матриксам. Кроме того, высокопористые изделия на основе лактидов и лактонов успешно зарекомендовали

себя в качестве объемных заместительных имплантатов, в частности в легочной хирургии [1]. Варьированием состава и концентрации полимеров в исходном растворе можно получать материалы различной пористости (до 98 об.%) и с различными значениями модуля упругости в диапазоне от 100 кПа до 10 МПа.

В работе в качестве полимерной основы губчатых изделий предложен сополимер полилактид-со-капролактон состава 70/30 с молекулярной массой 230 кДа. Соплимер такого состава обладает температурой стеклования близкой к температуре тела человека, что позволяет переходить изделиям на его основе из временной в постоянную форму после имплантации. Это свойство, в свою очередь, открывает большие перспективы в области заместительной терапии, ввиду возможности имплантации изделий через небольшие малоинвазивные хирургические разрезы.

Полученные в работе губчатые материалы способны полностью восстанавливать свою форму после предварительной деформации на сжатие в два раза от первоначальных размеров.

Литература:

1. Васильева И.А., Севастьянов В.И., Токаев К.В., и др. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021. Т. 23. № 1. С. 49–59.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ НА ОСНОВЕ ОРГАНОРАСТВОРИМОГО ХИТОЗАНА

А.А. Захаревич, Т.Е. Григорьев

НИЦ Курчатowski институт, Москва, Россия

e-mail: bestiamalum@yandex.ru

Ключевые слова: химическая модификация хитозана, органорастворимый хитозан, полимеры для регенеративной медицины.

Хитозан представляет собой частично деацетилированное производное хитина. Уникальные свойства хитозана обусловлены наличием в его цепи свободных аминогрупп, которых нет в молекуле хитина. Благодаря способности первичных аминогрупп к протонированию при значениях pH ниже 6,3–6,5, хитозан растворим в разбавленных кислотах [1]. Кроме того, аминогруппы определяют такие биологические эффекты хитозана, как антимикробная, противовоспалительная и фунгицидная активность и являются сайтом воздействия химических агентов при модификации полимера. Все эти свойства позволяют получать материалы различной морфологии на основе хитозана и объясняют популярность полимера в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Однако некоторые методы получения материалов медицинского назначения, например, электроформование, требуют использования органических растворителей, в которых хитозан нерастворим. На растворимость этого биополимера в органических средах можно повлиять путем химической модификации, что существенно расширит сферу его применения. Одним из наиболее эффективных способов получения органорастворимых производных хитозана является O-ацилирование по C₆-ОН-группе. Для проведения данной реакции можно использовать как ангидриды, так и хлорангидриды органических кислот [2].

В данной работе была проведена модификация хитозана с использованием бутирилхлорида, поскольку

производные масляной кислоты — бутираты — находят широкое применение в медицине. Так как наряду с гидроксильными группами в реакцию ацилирования вступают и первичные аминогруппы [3], простым и изящным решением стало использование фталимидной защиты аминогрупп. Полученный 6-О-бутирилхитозан хорошо растворим в сильнополярном органическом растворителе диметилсульфоксиде (ДМСО). Из раствора в ДМСО были получены пористые и волокнистые материалы на основе бутирилхитозана. После модификации в цепи полимера сохраняются первичные аминогруппы, что определяет его повышенную биосовместимость и биологическую активность, а растворимость в органических средах открывает новые возможности применения полимера в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Работа выполнена при поддержке госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Kumar G., Bristow J.F. et al. *Polymer*. 2000. Vol. 41. N. 6. PP. 2157–2168.
2. Nabel A.N., Hefni H.H. et al. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 157. P. 681–702.
3. Wenqian W., Qiuyu M. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 487.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

**И.С. Захарова¹, А.И. Шевченко¹, Н.А. Тмоян²,
Е.А. Елисафенко¹, Е.С. Зубкова², А.А. Слепцов³,
М.С. Назаренко³, Н.В. Желтышева¹, М.В. Ежов²,
В.В. Кухарчук², Е.В. Парфёнова², С.М. Закиян¹**

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

² НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова,
Москва, Россия

³ Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН, Томск, Россия

e-mail: zakharova.is@gmail.com

Ключевые слова: клеточные модели заболеваний, семейная гиперхолестеринемия, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные производные, эндотелиоциты, гепатоциты, органоиды.

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) является серьезной проблемой мирового общественного здравоохранения [1]. Данное моногенное наследственное заболевание является одной из причин атеросклероза, лежащего в основе сердечно-сосудистых патологий, которые продолжают оставаться лидирующими причинами смерти людей во всем мире. В основе большинства случаев заболевания — патологические варианты в гене рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR.

До сих пор в мире не существует клеточных моделей СГХС, отражающих комплекс взаимодействий разных клеточных типов, вовлеченных в проявление заболевания. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) пациентов дают возможность получать дифференцированные клеточные производные малоинвазивным методом. Существует менее десятка 2D-моделей, представленных только одним типом клеток, вовлеченных в заболевание, — гепатоцит-подобными клетками. Однако такие дифференцированные производные функционально являются незрелыми — паттерн их генной

экспрессии напоминает клетки эмбриональной печени. В то время как 3D-васкуляризированные органоиды с гепатоцитами-производными ИПСК напоминают зрелые гепатоциты.

В результате репрограммирования мононуклеарных клеток крови трех пациентов, являющихся компаундными гетерозиготами по патологическим аллельным вариантам гена LDLR, получены ИПСК, демонстрирующие свойства плюрипотентности и нормальный кариотип [2–4]. Наличие аллельных вариантов в ИПСК подтверждено секвенированием по Сенгеру. Из ИПСК пациентов с СГХС путем направленной дифференцировки получены три типа дифференцированных производных: гепатоцит-подобные клетки, эндотелиоциты и мезенхимные стромальные клетки (МСК) с подтверждением наличия характерных маркеров для каждого типа клеток. Эндотелиальные и МСК-производные получены для пациентов с СГХС впервые. Дифференцированные производные имеют сниженную способность поглощать ЛПНП, что является функциональным подтверждением воспроизведения патологического фенотипа заболевания.

В результате объединения трех типов полученных дифференцированных производных впервые получены васкуляризированные гепато-органойды пациентов с СГХС, которые станут основой для разработки подходов к более эффективной терапии СГХС и атеросклероза. Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00065.

Литература:

1. Semenova A.E., Sergienko I.V., Garcia-Giustiniani D. et al. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2020. V. 7. № 2. P. 16.
2. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. *Stem Cell Res.* 2022. V. 60. Art. № 102703.
3. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. *Stem Cell Res.* 2022. V. 60. Art. № 102702.
4. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. *Stem Cell Res.* 2022. V. 59. Art. № 102653.

ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИН ПРЕПЯТСТВУЕТ ГИБЕЛИ ПЕРВИЧНОЙ НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ

**А.Е. Згодова^{1,2}, С.И. Павлова³, А.А. Некрасова¹,
Д.П. Бояркин¹, А.М. Сурин^{1,4}, З.В. Бакаева^{1,5}**

¹ НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский
университет), Москва, Россия

³ Чувашский государственный университет
им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

⁴ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва,
Россия

⁵ Калмыцкий государственный университет
им. Б.Б. Городовикова, Элиста, Россия

e-mail: arinbox@list.ru

Ключевые слова: изоликвиритигенин, глутаматная эксайтотоксичность, кальциевый гомеостаз, митохондриальный потенциал, митохондриальное и немитохондриальное дыхание.

Глутамат (Глу) является важным эндогенным нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих, однако в высоких концентрациях вовлечен в развитие многих острых и хронических патологий головного мозга. При токсическом действии Глу в нейронах развивается отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД) и синхронная с ней митохондриальная деполяризация. Изоликвиритигенин (ИЛГ)

относится к флавоноидам со структурой халкона, происходящим из растения рода *Glycyrrhizae*. Опосредованная ILG нейропротекция была продемонстрирована в чувствительной к Глу линии клеток гиппокампа мыши. Мы предположили, что какие-то звенья патологического каскада реакций, обусловленных Глу эксайтоксичностью, могут быть ингибированы ИЛГ.

Цель работы: изучить влияние ИЛГ на кальциевый гомеостаз, физиологическую функцию митохондрий и оценить его нейропротекторный потенциал в условиях Глу эксайтотоксичности.

Материалы и методы: Выживаемость первичной культуры нейронов коры головного мозга крыс (10 DIV) при Глу-индуцированной токсичности оценивали биохимическим методом (WST-тест). Флуоресцентно-микроскопические измерения концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$) проводили на микроскопе Olympus XI-70 (Япония) в индивидуальных нейронах с использованием флуоресцентного красителя FuraFF (ex/em 340/525 и 380/525 nm). Параллельно, используя потенциал чувствительный зонд Rh123 (ex/em 485/525) измеряли митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$), для оценки вклада митохондрий в кальций-зависимые процессы. Скорость потребления кислорода (OCR, пмоль/мин) измеряли с помощью анализатора внеклеточного потока Seahorse XFe24 (Agilent Technologies, США).

Результаты: ИЛГ (0,5–5 мкМ) защищал первичную культуру нейроглиальных клеток от гибели ($p < 0,01$), вызванную глутаматом (100 мкМ). В нейронах ИЛГ (0,5–1 мкМ) предотвращал резкое повышение $[Ca^{2+}]_i$ и снижение $\Delta\Psi_m$, а также Глу-индуцированные изменения митохондриального и немитохондриального дыхания. В культуре с ИЛГ (1 мкМ) увеличивались резервное дыхание, а также OCR в ответ на Глу. ИЛГ-опосредованное увеличение немитохондриального потребления кислорода может быть связано с проявлением активности некоторых оксидаз. Одним из таких ферментов-кандидатов, которые могут экспрессироваться на фоне действия ИЛГ, являются гемоксигеназы, различные изоформы которого обнаруживаются в нервной системе и обладают нейропротекторным эффектом.

Заключение: Результаты показали, что ИЛГ может защищать нейроны коры от гибели, предотвращая развитие нарушения регуляции кальция и ограничивая митохондриальную дисфункцию, вызванную высокой дозой Глу. Мы предполагаем, что ИЛГ будет полезен при разработке лекарств для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся Глу эксайтотоксичностью. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант FGFU-2022-0012).

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ОКСИДОМ ГРАФЕНА НА РОСТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ

А.И. Зельцер¹, Р.А. Сурменев², М.А. Сурменова², К.В. Шайтан¹, А.П. Бонарцев¹, И.И. Жаркова¹

¹ Кафедра биоинженерии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Томский политехнический университет, Томск, Россия

e-mail: angelinazeltser@yandex.ru

Ключевые слова: магнитные наночастицы; мезенхимальные стволовые клетки; цитотоксичность; оксид графена.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в силу их низкой иммуногенности и способности к многолинейной дифференцировке активно используются в регенеративной медицине для терапевтических целей. Для раскрытия терапевтического потенциала МСК применяют магнитные наночастицы (МН). МН способствуют направленной доставке и локализации МСК в области мишеней, кроме того, могут служить для трансфекции репортерных генов в МСК [1]. МН на основе оксида железа комбинируют с оксидами графена для уменьшения токсичности [2].

В работе использовались МН на основе Fe_3O_4 , покрытые лимонной кислотой (М/ЛК) и МН с добавлением оксида графена, покрытые лимонной кислотой (М/ГО/ЛК). Подбор концентраций МН осуществлялся на основе анализа статей по смежным исследованиям [3,4].

Был использован III пассаж МСК, выделенных из костного мозга 5-дневных крыс. Клетки засеивали в 96-луночный планшет в количестве 1500 кл/луночку. Через 24 часа после засева вводили МН в концентрации 100, 50 и 30 мкг/мл и культивировали при 37 °C и 5% CO_2 . Оценку цитотоксичности проводили с помощью теста Alamar Blue. Снимали данные теста на 1 и 4 сутки инкубации с МН. Критерием цитотоксичности считали рост клеток менее 70% в сравнении с контролем [5].

Полученные результаты свидетельствуют о наличии цитотоксичности образца М/ЛК С=100 мкг/мл, однако для образца М/ГО/ЛК в той же концентрации цитотоксичность не выявлена. М/ЛК при С=50 мкг/мл и 30 мкг/мл не показали токсичности для МСК, но растворы тех же концентраций частиц М/ГО/ЛК активнее стимулировали рост МСК. Причем пролиферативная активность МСК при М/ГО/ЛК при С=50 мкг/мл была выше, чем при С=30 мкг/мл. Оксид графена способен стимулировать рост и пролиферацию МСК, что дает хорошие перспективы для его использования в регенеративной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-64-47008.

Литература:

1. Yun W.S., Aryal S., Ahn Y.J. et al. Biomed Eng Lett. 2020.
2. Gonzalez-Rodriguez R., Campbell E., Naumov A. PLoS One. 2019.
3. Chen J., Liu J., Hu Y. et al. Sci Technol Adv Mater. 2019.
4. Ignatovich Z., Novik K., Abakshonok A. et al. Molecules. 2021.
5. ГОСТ ISO 10993-5-2011

МОДУЛЯТОР TRPC6 ПРОЯВЛЯЕТ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА, ВОССТАНАВЛИВАЕТ КОНТЕКСТНУЮ, УСЛОВНУЮ, НО НЕ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ПАМЯТЬ

Н.И. Зернов, Е.А. Попугаева

Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: quakenbush97@gmail.com

Ключевые слова: нейробиология, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера, дендритные шипики

Болезнь Альцгеймера (БА) — это нейродегенеративное заболевание, отличительной чертой которого является прогрессирующая потеря памяти. Нарушение памяти может быть объяснено синаптической дисфункцией, которая наблюдается при БА. Синапс (место контакта двух

нейронов) образуется с помощью дендритных шипиков, плотность и морфология которых изменяется у пациентов с БА.

Кальциевая дисрегуляция играет важнейшую роль в развитии БА. В частности, обнаружено, что при БА в гиппокампаальных нейронах снижается активность нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК). Одним из участников белкового ансамбля, формирующего нДУВК, — TRPC6 каналы [1]. Позитивное воздействие на TRPC6 канал, предположительно, позволит осуществить регенерацию дендритных шипиков и тем самым устранить проблемы с памятью.

Нами было выявлено, что положительный модулятор TRPC6 канала С2О в концентрациях 1 μ M и 100 nM ограничивает утрату грибовидных шипиков при воздействии на нейроны β -амилоидом. Мы также продемонстрировали, что С2О способно восстанавливать дефицит долгосрочной потенциации у восьмимесячных 5xFAD мышей. Фармакокинетические исследования (стабильность в плазме крови и проницаемость через ГЭБ) позволили провести поведенческие тесты на животных.

Поведенческие тесты включали в себя тест на условно-рефлекторное замирание (изучение контекстной и условной памяти) и водный лабиринт Морриса (изучение пространственной памяти). Внутривентрикулярные инъекции С2О способствуют восстановлению контекстной и условной памяти у шестимесячных 5xFAD мышей, однако никакого улучшения пространственной памяти обнаружено не было. Данное научное исследование было проведено в рамках грантовой программы поддержки лучших проектов иностранных аспирантур «BIG PhD» в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого.

Литература:

1. Zhang H., Sun S., Wu L. et al. J. of Neuroscience 2016. V. 36. P. 11837–11850.

ПОЛИМЕРНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ С ЭФФЕКТОМ ПАМЯТИ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА И НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА ДЛЯ АДАПТИВНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

А.И. Зими́на, А.А. Никитин, В.А. Львов, С.С. Водопьянов, Ф.С. Сенатов

НИТУ МИСИС, Москва, Россия

e-mail: a.zimina@misis.ru

Ключевые слова: эффект памяти формы; полилактид; феррит кобальта.

На данный момент в реальных хирургических операциях используют адаптивные медицинские изделия (зажимы, скобы, клипсы и т.д.) из металлических сплавов с памятью формы. Однако у металлических материалов есть ряд очевидных недостатков, таких как ограниченная восстанавливаемая деформация, возможность перенапряжения, отсутствие способности к биорезорбции. Эти ограничения могут быть преодолены при использовании полимеров с памятью формы и композитов на их основе. Преимуществами полимерных материалов являются более высокие значения восстанавливаемой деформации, возможность регулирования температуры активации эффекта памяти формы, механических и физико-химических характеристик. Еще одним очевидным преимуществом является возможность инициировать

эффект памяти формы дистанционно, т.е. без прямого теплового воздействия, например, с помощью лазерного нагрева или воздействия электрических и магнитных полей. В контексте использования таких материалов в организме человека преимуществом обладает индукционный нагрев (воздействие магнитного поля) полимерного композиционного материала с включениями магнитных частиц, так как данный метод исключает травматизацию тканей человека и действует только на магнитные частицы в композите. Так, композиционный материал на основе полилактида (ПЛА) с магнитными частицами, такими как наночастицы феррита кобальта (CoFe_2O_4) [1], может быть нагрет путем приложения высокочастотного переменного магнитного поля.

В данной работе методом экструзии были получены нити композита ПЛА и CoFe_2O_4 (1, 5, 10 % масс.). Было замечено, что включение дисперсного наполнителя влияет на тепловые свойства и кристалличность полимерной матрицы. Образцы всех трех составов демонстрируют восстановление формы после деформации при воздействии магнитного поля. Материал не является цитотоксичным, поэтому его можно использовать в биомедицинских целях.

Таким образом, использование полимерного композиционного материала на основе ПЛА с возможностью косвенного нагрева для активации эффекта памяти формы может решить текущие проблемы, связанные с уже существующими и используемыми материалами для данного приложения. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 21-73-205).

Литература:

1. Garanina A.S., Naumenko V.A., Nikitin A.A. et al. Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med. 2020. V. 25. P. 102171.

МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПОЖИЛЫХ ДОНОРОВ ДЕМОНСТРИРУЮТ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ В ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОМ, ПРОЛИФЕРАТИВНОМ ПОТЕНЦИАЛАХ И ИНСУЛИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

А.А. Зиновьева¹, Е.Бахчинян¹, Е.С. Войнова¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, В.Ю. Сысоева¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹, А.Ю. Ефименко¹, В.И. Чечехин¹, Н.С. Волошин¹

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет Фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: zinovevaanna356@gmail.com

Ключевые слова: МСК, старение, дифференцировка, пролиферация, кальциевая сигнализация.

Старение — это биологический процесс постепенной деградации частей и систем организма человека и последствия этого процесса. Важную роль в прогрессии процесса старения играет неизбежное истощение резервов стволовых клеток организма, что ведет к снижению способности к поддержанию гомеостаза, а также к нарушению функционирования и восстановления тканей и органов [1]. Целью нашей работы было оценить изменения, происходящие с резидентными стволовыми клетками жировой ткани — мезенхимными стволовыми клетками при старении.

В нашей работе использовались МСК, полученные от контрольной группы (возраст не более 65 лет) и пожилых доноров (возраст старше 65 лет). Кроме того, нами использовались МСК, индуцированные к накоплению старческих признаков за счет продолжительного культивирования (более 10 пассажей: группа репликативное старение).

Индукцию адипогенной дифференцировки осуществлялась при помощи дексаметазона, инсулина и IBMX. Для оценки эффективности дифференцировки клеток использовали цитофлуоресцентное окрашивание с помощью красителя Nile Red. Кроме того, дифференцировка оценивалась методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией по экспрессии ключевых маркеров дифференцировки [2]. Для оценки активности инсулин-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов использовался метод иммуноблоттинга. Изучение пролиферативного потенциала осуществлялась, используя иммуногистохимическое окрашивание на белок Ki67. Для анализа кальциевого ответа на инсулин использовался флуоресцентный кальциевый краситель Fluo-8.

В нашей работе мы обнаружили, что у многих пожилых доноров наблюдается снижение чувствительности к инсулину, коррелирующее со сниженной способностью к пролиферации и адипогенной дифференцировке. При оценке внутриклеточного кальция в ответ на инсулин наблюдались 2 вида кальциевых ответов: плавный прирост, характерный для клеток, полученных от контрольной группы, и кальциевая осцилляция, характерная для пожилых доноров. Интересно, что МСК, полученные от пожилых доноров, обладали высокой степенью гетерогенности с точки зрения их пролиферативного и дифференцировочного потенциалов, а также чувствительности к инсулину. В дальнейшем мы планируем установить причины подобной гетерогенности.

Литература:

1. Sorokina A.G. и др. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022. № 8 (20). С. 3051.
2. Kulebyakin K. и др. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. (9).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАНТОВ МАРАЛА В КОМБИНАЦИИ С АМИКАЦИНОМ ДЛЯ КУПИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА

**В.О. Золотухин, А.А. Андреев,
А.А. Глухов, В.В. Шишкина**

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

e-mail: Vladimir.zolotuxin@gmail.com

Ключевые слова: хирургия, остеомиелит, панты марала, хирургическая санация.

Остеомиелит — наиболее сложный вариант развития воспаления костной ткани, которое диагностируется в 3–24% после открытых переломов и в 1–7% после остеосинтеза [1]. Рецидивы заболевания встречаются у 20–30% больных, а частота ампутаций и функциональной неполноценности достигает 10,3–56,8% случаев [1, 2].

Целью данного исследования являлось изучение эффективности применения пантов марала и амикацина в купировании хронического остеомиелита.

Исследование проведено на самцах крыс линии Wistar с массой 300 ± 20 граммов на базе НИИ ЭБМ ВГМУ им Н.Н. Бурденко. Моделирование хронического остеомиелита проводили согласно патенту: «способ моделирования хронического травматического остеомиелита». Животные были разделены на 5 групп: В 1-й контрольной группе лечение не проводилось. В остальных группах выполняли 2-этапную гидрохирургическую санацию (ГХС). В 1-й опытной группе ГХС и внесение в область раны пантов марала до полного заполнения полости. Во 2-й опытной группе — введение антибиотика амикацина в дозировке 15 мг/кг. В 3-й опытной группе использовали сочетанное применение пантов марала и амикацина в дозировке 1:2. Оценку эффективности проводили на 7-е, 14-е, 28-е, и 90-е сутки исследования на основании данных гистологического исследования.

В 1-й контрольной группе на протяжении всего эксперимента прослеживается гистологическая картина воспаления. Во 2-й контрольной группе начиная с 14-х суток эксперимента наблюдается пролиферация остеобластов. На 90-е сутки эксперимента наблюдается образование новых сосудов, появление грануляционной ткани в области дефекта и остеогенез в периосте и костномозговом канале.

В 1-й опытной группе динамика аналогична динамике 1-й контрольной группы, на 90-е сутки происходит формирование ложных суставов в месте патологического перелома с большим количеством остеобластов и нейтрофилов. Во 2-й опытной группе к 60-м суткам наблюдается полное заполнение дефекта молодой костной тканью. На 90-е сутки происходит формирование консолидированной костной мозоли. В 3-й опытной группе разрастание грануляционной ткани наблюдается уже на 14-е сутки вместе с признаками эндостального окостенения. На 90-е сутки полностью завершается регенерация костной ткани.

Использование комбинированного препарата, состоящего из амикацина (в дозировке 15 мг/кг) и порошкообразных пантов марала в соотношении 2:1, ведет к купированию очага остеомиелита и формированию костной мозоли на 90-е сутки исследования.

Литература:

1. Золотухин В.О. Научное обозрение. Педагогические науки. 2019. № 5–3. С. 60–64.
2. Золотухин В.О., Глухов А.А., Андреев А.А. Гены и Клетки. — 2019. — Т. 14, № 5. — С. 97–98.

ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ В ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛАХ, ПРОИЗВОДНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Д.Б. Зоров^{1,2}, Л.Д. Зорова^{1,2}, С.И. Ковальчук³, В.А. Попков^{1,2}, В.П. Черников⁴, А.А. Жарикова⁵, А.А. Хуторненко², С.Д. Зоров^{1,5}, К.С. Плохих⁶, Р.А. Зиновкин¹, Е.А. Евтушенко⁷, В.А. Бабенко^{1,2}, И.Б. Певзнер^{1,2}, Ю.А. Шевцова^{2,5}, К.В. Горюнов², Е.Ю. Плотников^{1,2}, Г.Т. Суших², Д.Н. Силачев^{1,2}

¹ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

³ Институт биорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

⁴ НИИ Морфологии человека РАН, Москва, Россия,

⁵ Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия

⁷ Биологический Факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

e-mail: zorov@belozersky.msu.ru

Ключевые слова: митохондрии, терапия, стволовые клетки, экстраклеточные везикулы.

С недавнего времени наряду с клеточными технологиями возникло целое направление по субклеточным технологиям, которые, в частности, в терапии ряда патологий предполагают трансплантацию митохондрий и использование экстраклеточных везикул (ЭВ), производимых стволовыми клетками.

Есть свидетельство наличия митохондриальных компонентов в ЭВ, хотя данные о том, что ЭВ содержат компетентные в энергетическом плане митохондрии отсутствуют. Это определило задачу данной работы как решение вопроса: содержат ли ЭВ, образуемые в среде культивации мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека, функциональные митохондрии?

Просвечивающая электронная микроскопия позволила проследить за образованием ЭВ из МСК через почкование клеточной мембраны или путем организации пула ЭВ, собираемых внутри МСК. Были получены два препарата ЭВ через дифференциальное центрифугирование среды культивации в разных режимах, которые исследовались на предмет наличия митохондриальных компонентов и полностью функциональных митохондрий. ЭВ в обоих препаратах характеризовались сильной гетерогенностью форм, подтвержденной как просвечивающей, так и крио электронной микроскопией, и размеров, определяемых по дзета потенциалу и через анализ траекторий наночастиц.

Проточная флуориметрия с использованием двух митохондриальных красителей (MitoTracker Green, окрашивающих все митохондрии и TMRE, окрашивающих лишь энергизованные митохондрии) не позволила выявить однозначно интерпретируемый митохондриальный сигнал. Использование того же метода с применением 10-нонил акридинового оранжевого привело к доказательству его взаимодействия с ЭВ, что позволило предположить наличие кардиолипина, являющегося маркерным липидом внутренних мембран митохондрий.

С использованием праймеров на компоненты митохондриальной и ядерной ДНК (мДНК и яДНК соответственно) удалось не только обнаружить эти виды, но и отметить обогащение мДНК в ЭВ: если в МСК принять соотношение мДНК/яДНК=1, то в ЭВ это соотношение было около 20. Вестерн блот анализ выявил наличие в ЭВ целого ряда митохондриальных белков, однако подвижность части этих пептидов при ЭФ в ПААГ отличалась от стандартного поведения.

Анализатор кислорода SeaHorse позволил зарегистрировать потребление кислорода ЭВ при использовании субстратов комплексов I-III дыхательной цепи митохондрий. Однако скорость этого потребления не менялась при добавлении как разобщителя (СССР), так и ингибиторов цитохромоксидазы (цианида и азида), что говорит о том, что это потребление кислорода нельзя однозначно приписать дыханию.

Масс-спектрометрия выявила целый ряд митохондриальных белков внешних и внутренних мембран, межмембранного пространства и матрикса.

Таким образом в ЭВ присутствуют митохондриальные компоненты, а функциональных митохондрий обнаружить не удалось. Поддержано грантом РФФИ № 19-14-00173п.

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Е.С. Зубкова¹, А.П. Калинин¹, И.Б. Белоглазова¹, М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфёнова^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

² ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: cat.zubkova@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, воспаление, митохондрии, интерлейкин-4.

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является одним из ведущих методов клеточной терапии, обеспечивающим прочную связь между клиническими и фундаментальными исследованиями. Одним из популярных способов повышения эффективности клеточной терапии с помощью МСК является их обработка цитокинами. Мы выявили, что у МСК, инкубированных в присутствии интерлейкина 4 (ИЛ4) повышается резервная респираторная емкость, в то время как МСК, инкубированные в присутствии провоспалительных цитокинов показали тенденцию к ее снижению. Известно, что количество митохондрий тесно связано с энергетическими потребностями клетки и может варьироваться в зависимости от многих факторов, таких как стресс и окислительно-восстановительный баланс. Мы оценили количество митохондрий на клетку с помощью окрашивания витальной флуоресцентным митохондриальным зондом — MitoTracker Red CMXRos и последующего анализа методами спектрофлуориметрии и обнаружили увеличение количества митохондрий на клетку в МСК, инкубированных в присутствии ИЛ4 и тенденцию к уменьшению их числа в МСК, инкубированных в присутствии провоспалительных цитокинов, что может быть обусловлено усилением в них экспрессии факторов, ассоциированных с митофагией. Одна из функций митофагии — это удаление поврежденных митохондрий и таким образом предотвращение накопления митохондриальных реактивных форм кислорода (АФК) и повреждения клеток [1]. Мы оценили генерацию супероксид радикала,

как основного свободного радикала кислорода, образующимся в митохондриях в результате передачи электрона по ЭТЦ, с помощью флуоресцентного зонда MitoSox Red. Однако нам не удалось выявить значимой разницы между индукторами, только в случае LPS наблюдалась тенденция к усилению генерации АФК. Также мы оценили концентрацию молочной кислоты в среде культивирования МСК, как еще один параметр метаболизма, отражающий интенсивность процессов гликолиза в клетках. Полученные данные создают предпосылку к выяснению механизмов, опосредующих влияние воспалительного окружения на свойства мезенхимальных клеток, а также к разработке подходов активного воздействия на начальные этапы репаративных процессов, связанные с контролируемой воспалительной реакцией. Кроме того, приобретает актуальность дальнейшее исследование механизмов, сопрягающих аутофагию (в данном случае — митофагию) с со свойствами клеток, участвующими в реализации их биологической функции. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00405.

Литература:

1. Cadwell K. Nat Rev Immunol 16, 661–675 (2016).

ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ мРНК $\alpha 1A$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ НОРАДРЕНАЛИНА НА МСК

**А.М. Иванова, Р.А. Чанышев,
К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин**

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

e-mail: ivanovanastasia14@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки (МСК), норадреналин, $\alpha 1A$ -адренорецептор, гетерологическая сенситизация.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) входят в состав стромы соединительной ткани, где играют ключевую роль в ее репарации, регенерации и поддержании гомеостаза. МСК участвуют в этих процессах благодаря секреции различных паракринных факторов и способности дифференцироваться в ряд направлений. Важными компонентами стромы также являются кровеносные сосуды и нервные окончания, получающая гормональные сигналы от которых МСК координируют свою активность с целым организмом [1]. Одним из ключевых регуляторов функций МСК является норадреналин. Ранее мы показали, что норадреналин регулирует функциональную активность МСК, изменяя их чувствительность к норадреналину. При стимуляции норадреналином сигнального пути β -адренорецепторы/*Gs*-белок/аденилатциклаза/*cAMP* через 6 часов происходит повышение уровня экспрессии белка $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов и, как следствие, повышение чувствительности клеток к этому гормону. Данный феномен был назван гетерологической сенситизацией [2].

Для выяснения механизмов повышения белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов мы изучили влияния данного механизма на транскрипцию гена $\alpha 1A$ -адренорецептора, как одного из основных способов повышения белка в клетке. Для этого мы исследовали изменение уровня мРНК после стимуляции норадреналином. При использовании праймеров, таргетирующих начальный фрагмент мРНК $\alpha 1A$ -адренорецепторов, уровень мишени не изменялся, а при использовании праймеров, таргетирующих район

мРНК, имеющийся в составе 1–4 транскрипционных вариантов, уровень матрицы снижался. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что в процессе прохождения гетерологической сенситизации происходит изменение изоформного состава мРНК $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК. При изучении литературы мы выяснили, что с единственного гена $\alpha 1A$ -адренорецепторов в результате альтернативного сплайсинга считывается 7 транскрипционных вариантов с различными комбинациями экзонов. Для изучения изменений уровня экспрессии различных изоформ мы подобрали праймеры, специфичные для каждого транскрипционного варианта. Путем полуколичественного ПЦР-анализа мы исследовали изменение уровня экспрессии каждой изоформы через 1 и 3 часа после стимуляции норадреналином относительно клеток контроля. Таким образом, в процессе осуществления гетерологической сенситизации МСК происходит изменение изоформного состава мРНК $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов. Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках проекта № 21-15-00311.

Литература:

1. Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева и др. Acta Naturae. — 2011. — Т. 1. — С. 32–39.
2. Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I. et al. Sci. Rep. — 2016. — Vol. 6, N 1. — P. 32835.

МОДЕЛЬНЫЕ НАНОКОРПУСКУЛЯРНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ВНУТРИЯДЕРНОЙ ДОСТАВКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Е.В. Ивановская¹, В.А. Дятлов^{1,2}

*¹ Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

*² Институт тонких химических технологий
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

e-mail: kivanovskaia27@gmail.com

Ключевые слова: генная терапия, нанокорпускулярные носители, аддукт, этил-2-цианакрилат, внутриклеточный транспорт, доксорубин.

Эффективная генная терапия возможна только при использовании носителей, способных доставлять лекарственные препараты или гены внутрь клетки и ее оргanelлы на разных стадиях развития. Целью настоящей работы было изучение возможности доставки лекарственного средства внутрь ядра живых клеток на стадии их митоза.

В качестве модельного соединения использовали доксорубин — противоопухолевый антибиотик, проникновение которого внутрь клетки легко регистрировать методом конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии при экспериментах *in vitro*. Синтезированные полицианакрилатные частицы, полученные из аддукта этил-2-цианакрилата и жирных кислот, использовали в качестве носителя. Этил-2-цианакрилатные мономеры обладают рядом уникальных свойств, главным из которых является способность к полимеризации, в отсутствие радикальных инициаторов, с образованием полимеров, способных к биодegradации внутри организма (гидролизом и ферментативным гидролизом) [1]. Поверхность частиц была покрыта слоем полисахарида (реополиглюкина) и фосфатидилхолина с целью обеспечения трансмембранного проникновения системы внутрь клетки.

Наилучший результат был получен при использовании нанокорпускулярных полимерных носителей малого

диаметра, имеющих размер около 100 нм и обладающих зарядом поверхности близким к нейтральному. Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния. Такие системы способны проникать внутрь клетки, а также доставлять внутрь ядра на стадии митоза, на других стадиях развития клетки они инертны и не способны вмешиваться в процессы клеточного метаболизма.

При этом противоопухолевый препарат доксорубин является только модельным соединением, в дальнейшем полые нанокорпускулярные полимерные носители можно использовать для самых разнообразных физиологически активных веществ.

Литература:

1. Dyatlov V.A., Katz G.A. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules. Int. Application No PCT/IE 93/000005, Int. Publication No WO94/017789, 1994.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА КАРДИОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК

Г.А. Ивахова¹, Н.Б. Бильдюг²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nyadatep@gmail.com

Ключевые слова: МСК, фибробласты, кардиогенная дифференцировка, внеклеточный матрикс.

Неспособность к делению зрелых кардиомиоцитов — функциональных клеток сердца — ограничивает возможность получения стабильной клеточной линии для ее использования в качестве *in vitro* модели. В связи с этим огромное количество исследований направлено на кардиогенную дифференцировку различных клеток, включая эмбриональные (ЭСК), мезенхимные (МСК), индуцированные плюрипотентные (иПСК) стволовые клетки, а также фибробласты.

Большинство существующих методов кардиогенной дифференцировки предполагает использование на разных этапах культивирования комбинаций разнообразных факторов, влияющих на процесс кардиогенеза *in vivo*. В частности, наиболее эффективные протоколы получения кардиомиоцитов из иПСК и фибробластов включают многократные этапы вирусной трансдукции и использование различных многокомпонентных дифференцировочных сред [1, 2]. Однако такие манипуляции существенно ограничивают возможности применения полученных клеток в качестве тест-систем, в частности, для исследования лекарственных препаратов *in vitro*. Таким образом, существует необходимость в упрощенных методах кардиогенной дифференцировки, включающих введение минимального количества экзогенных факторов, потенциально препятствующих проведению дальнейших *in vitro* анализов.

На сегодняшний день накопилось достаточное количество данных о том, что наряду с растворимыми факторами важным регулятором кардиогенеза является внеклеточный матрикс (ВКМ) [3]. В связи с этим, настоящая работа была направлена на оценку кардиогенного потенциала клеток различного происхождения при их культивировании в присутствии компонентов ВКМ. В работе использовали МСК из костного мозга эмбриона человека и мышцы конечности эмбриона человека

(получены из ЦКП «КККП» ИИЦ РАН, грант Минобрнауки РФ, Соглашение № 075-15-2021-683), а также фибробласты, полученные из ткани сердца крыс. В ходе работы было показано, что культивирование МСК и фибробластов на белках ВКМ приводило к существенному изменению их морфологии. С помощью метода иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии был выявлен ранний маркер кардиогенной дифференцировки GATA4 в клетках, культивируемых на коллагене. Кроме того, культивирование МСК на коммерческом препарате «Matrigel» приводило к формированию в единичных клетках характерного для кардиомиоцитов миофибрилярного аппарата. Полученные результаты могут применяться при разработке эффективных методов кардиогенной дифференцировки, а также для оптимизации модельных тест-систем *in vitro*.

Литература:

1. Guan X., Wang Z., Czerniecki S., et al. Hum. Gene Ther. Clin. Dev. 2015. V. 26(3). PP. 194–201.
2. Nam Y.J., Song K., Luo X., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V 110(14). PP. 5588–93.
3. Bilydug N. Int. J. Cardiovasc. Res. 2017. V. 6 (2). PP. 1–7.

СОЗДАНИЕ ФИБРИНОВЫХ СКАФФОЛДОВ, ЗАСЕЛЕННЫХ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ПУЛЬПЫ И ПЕРИОДОНТА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Д.А. Иволгин¹, Ю.А. Домбровская¹, Н.И. Енукашвили^{1,5}, Р.Е. Банашков², Н.Ю. Семенова³, И.А. Карабак⁴, А.В. Котова^{1,5}, А.В. Силин¹

¹ ФГБОУ ВО Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Независимый центр рентгенодиагностики «Пикассо», Санкт-Петербург, Россия

³ РосНИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: ida59m@mail.ru

Ключевые слова: скаффолд, фибриновый клей, стволовые клетки пульпы и периодонта, остеогенная дифференцировка, направленная костная регенерация/

Создание трехмерных структур- скаффолдов- из биодеградируемых материалов и заселение их стволовыми клетками, полученными из тканей полости рта, перспективно для методик направленной регенерации тканей. Стволовые клетки пульпы и периодонта в большей степени способны к остеогенной дифференцировке, что биологически обуславливает их применение при реконструктивных операциях на костной ткани. Целью исследования явилась оценка заживления костного дефекта в области альвеолярной части нижней челюсти лабораторных мышей с использованием фибринового скаффолда, заселенного стволовыми клетками пульпы и периодонта.

В исследовании 29 лабораторным мышам проводилось удаление моляров и формирование костного дефекта. В качестве замещающего материала использовали фибриновый клей, полученный из плазмы крови

человека с использованием рекомбинатного тромбина. Фибриновый клей смешивали с клетками паспортизированной культуры ранних (2–3) пассажей стволовых клеток пульпы зуба [1]. Далее клеточнозаселенные скаффолды, вносили в область дефекта. Через 28 дней после удаления моляров животных выводили из эксперимента, проводили компьютерную томографию челюстно-лицевой области и гистологический анализ области дефекта.

Показано влияние клеточнозаселенных скаффолдов на процессы ремоделирования костной ткани в области дефекта. В основной группе наблюдался прирост костной ткани по сравнению с контрольной. Таким образом, доказана способность стволовых клеток пульпы зуба, заключенных в скаффолд на основе фибринового клея, сохранять способность к пролиферации и к остеогенной дифференцировке. Использованный скаффолд на основе фибринового клея влияет на процесс ремоделирования костной ткани в области дефектов челюстей [2].

Литература:

1. Домбровская Ю.А., Енукашвили Н.И., Котова А.В. и др. Трансл. Мед. 2020. Т.7. № 1. С. 59–69.
2. Домбровская Ю.А., Енукашвили Н.И., Банашков Р.Е. и др. Пародонтология. 2021. Т. 26. № 2. С. 96–103.

ИНДУКЦИЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ CDNF ПРИ ПОМОЩИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО КОНСТРУКТА ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЯМ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС

Т.В. Ильчибаева¹, А.С. Цыбко¹, Р.С. Ярков², Д.В. Ерёмин¹, М.В. Ведунова², В.С. Науменко¹

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

² Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

e-mail: rbicenok@mail.ru

Ключевые слова: Дофаминовый нейротрофический фактор мозга, CDNF, аденоассоциированный вирус, AAV, нейрональная пластичность, память о страхе, поведение крыс.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) считается перспективным фактором для лечения различных нейродегенеративных расстройств. Мало что известно об участии CDNF в регуляции поведения, помимо локомоторной активности в рамках моделей болезни Паркинсона. Имеются некоторые данные, указывающие на роль CDNF в улучшении памяти в животной модели болезни Альцгеймера, однако неизвестно какие механизмы стоят за этими эффектами.

В данной работе мы создали аденоассоциированный вирусный конструктор, экспрессирующий ген *Cdnf* крысы под контролем синапсинаового промотора. Иммуноцитохимия трансфицированных AAV-CDNF клеток HEK293 показала локализацию CDNF исключительно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Трансфекция также улучшила выживаемость данных клеток в ответ на стресс ЭПР, что доказывает функциональную активность экспрессирующегося белка.

В последующих экспериментах полученный AAV-конструктор был использован для того, чтобы вызвать сверхэкспрессию CDNF в нейронах гиппокампа взрослых самцов крыс линии Wistar. Было обнаружено, что гиперэкспрессия CDNF в гиппокампе усиливает угасание

памяти о страхе в парадигме условного рефлекса страха. Изменения памяти о страхе сопровождались повышенным уровнем мРНК и фосфорилирования CREB, вовлеченного в формирование долговременной потенции. В то же время сверхэкспрессия CDNF приводила к увеличению уровней мРНК генов маркеров стресса ЭПР — *Atf6*, *Perk* и сплайсированного *Xbp1*, в регуляции которых, как уже известно, участвует CDNF. В первичной нейрональной культуре гиппокампа крыс сверхэкспрессия CDNF стимулировала формирование пачечной активности и значительно увеличивала не только частоту спайков, но и количество спайков в сетевой пачке. Также было показано, что CDNF увеличивает не только количество связей на клетку, но и согласованность сигналов в культуре нейронов. Процент активных клеток в культуре увеличился более чем в два раза.

Таким образом мы впервые показали, что эндогенно-экспрессирующийся CDNF способен регулировать формирование памяти о страхе, что связано с существенными изменениями в пластичности гиппокампальных нейронов и вероятно вовлекает уникальный ЭПР-зависимый механизм. Полученные результаты свидетельствуют, что CDNF может быть перспективным средством терапии неврологических нарушений, например при болезни Альцгеймера.

Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом № FWNR-2022-0023. Исследование было поддержано Российским научным фондом, грант № 22-15-00011.

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ОЛИГОМЕРЫ НА ОСНОВЕ ЛАКТОНОВ ДЛЯ БИОПЕЧАТИ

А.К. Илющенко¹, К.Т. Калинин¹, Н.Г. Седуш^{1,2}, А.Е. Крупнин¹, С.Н. Чвалун^{1,2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

e-mail: ilyushchenko.ak@phystech.edu

Ключевые слова: биоразлагаемые материалы, лактид, скаффолды, биопечать.

Биоразлагаемые биосовместимые полимеры на основе циклических сложных эфиров активно применяются в качестве исходных материалов для изготовления изделий медицинского назначения: матриц и скаффолдов для тканевой инженерии, хирургических нитей, эндоваскулярных имплантатов, а также различных фиксаторов для травматологии и челюстно-лицевой хирургии. Применение аддитивных технологий дает возможность изготовления биоразлагаемых имплантатов сложной формы, в том числе персонализированных. Методы фотополлимерной 3D-печати являются одними из наиболее прецизионных, обеспечивая высокую точность печати, позволяют изготавливать даже миниатюрные конструкции. Однако на сегодня выбор биосовместимых фотоотверждаемых композиций крайне ограничен. Фотополлимерные смолы для изготовления биоразлагаемых медицинских изделий фактически отсутствуют на рынке.

Мы представляем модифицированные олигомеры D,L-лактида и ε-капролактона линейного и звездообразного строения, которые могут быть использованы в фотополлимерной и биопечати биоразлагаемых медицинских изделий. Для создания гибкой и эффективной платформы фотополлимерных композиций важно

разработать ассортимент смол на основе олигомеров различного состава и молекулярного строения. Это обеспечит возможность регулировать свойства и кинетику деградации изготовленных изделий. Поэтому основной целью работы было установить влияние состава и молекулярной архитектуры олигомеров на свойства получаемых на их основе сшитых материалов. На первом этапе методом полимеризации с раскрытием цикла были синтезированы и комплексно охарактеризованы линейные и звездообразные (3- и 6-лучевые) олигомеры с длиной луча от 5 до 50 звеньев. Далее была проведена их модификация производным метакриловой кислоты для получения УФ-сшиваемых соединений. Отверждение олигомеров проводили в присутствии фотоинициатора при температуре 60 и 100 °С. Показано, что в зависимости от молекулярной структуры исходных олигомеров, сшитые материалы характеризовались модулем упругости от 5 до 1 850 МПа, прочностью от 2 до 35 МПа и деформируемостью от 1 до 300%. При нагревании олигомеры демонстрируют достаточно низкую вязкость и высокую скорость сшивания, что делает их перспективными для 3D-печати методом стереолитографии. Показано, что олигомеры могут быть использованы и в биопечати. С применением биопринтера Allevi 3 изготовлены биодеградируемые скаффолды с гироидной структурой. Регулируемые в широком диапазоне механические характеристики открывают возможность гибкого «настраивания» свойств материалов и изготовления персонализированных скаффолдов для решения различных биомедицинских задач. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых — кандидатов наук (проект МК-5517.2021.1.3).

СОЗДАНИЕ БИОТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ СПОНДИЛОДЕЗА НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, ЧЕЛОВЕКА

**А.Г. Ионова¹, С.М. Космачева¹, К.А. Криворот²,
А.Н. Мазуренко², А.В. Малашенко²,
М.П. Потапнев¹, В.И. Асаевич¹**

¹ *Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь*

² *Республиканский научно-практический центр ортопедии и травматологии, Минск, Республика Беларусь*

e-mail: al_ionova96@mail.ru

Ключевые слова: спондилит, биотрансплантат, мезенхимальные стромальные клетки; плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов.

Спондилит — хирургическое вмешательство, направленное на создание неподвижности между смежными позвонками с помощью установки между ними имплантата из титана и формирования костной основы на основе компонентов биотрансплантата. В 3–15% случаев спондилит осложняется несращением или образованием ложных суставов.

Цель исследования — разработать биотрансплантат для спондилита с использованием мезенхимальных стромальных клеток и оценить эффективность его применения в клинике.

Материалы и методы. Основу имплантируемого биотрансплантата составлял биодеградируемый сетчатый имплантат по объему имеющегося костного дефекта. В состав биотрансплантата входили резерцируемая аутологичная костная ткань позвонка и коллагеновая губка, пропитанная плазмой, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ аллогенной), и аутологичные мезенхимальные стромальные клетки (МСК, 18–30 млн клеток). МСК получали из 20 мл пунктата костного мозга пациента, наращивали *in vitro* в течение 21–24 дней с использованием АВ (IV) сыворотки человека и преддифференцировали в остеогенном направлении в течение 3–4 дней в присутствии остеогенных факторов. Биотрансплантат формировался *in situ* при проведении операции спондилита 11 пациентам: 4-м — по поводу псевдоартроза, 7-ми — в связи с высокой вероятностью его формирования. Группу сравнения, сопоставимую по полу, возрасту, клиническому статусу, составили 10 пациентов, оперированных первично без применения МСК и ПОРФТ аллогенной. Эффективность лечения пациентов оценивали через 6 и 12 месяцев по клиническому статусу, рентгеновской компьютерной томографии, путем анкетирования с последующей статистической обработкой полученных данных.

Результаты. Ранних и отдаленных послеоперационных осложнений применения биотрансплантатов выявлено не было. У 80% пациентов основной и группы сравнения через 6 месяцев после операции сформировался костный блок, у остальных пациентов отмечена стадия консолидации. К 12 мес. наблюдения у всех пациентов был сформирован костный блок. У пациентов основной группы индекс болевого синдрома был в 5,3 раза ниже по сравнению с пациентами группы сравнения ($6,4 \pm 3,6$ и $34,0 \pm 22,7$ баллов соответственно). Ни у одного пациента из группы риска формирования псевдоартроза, а также у пациентов, которым выполнялись повторные хирургические операции по поводу псевдоартроза, в отдаленном периоде ложный сустав не сформировался.

Заключение. Разработанный биотрансплантат на основе МСК и ПОРФТ аллогенной позволяет достичь костного блока у пациентов, нуждающихся в межтеловом спондилите позвоночника с предшествующими хирургическими вмешательствами, не приведшими к формированию сращения, и имеющими факторы риска образования ложного сустава.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ РОДА VACCINIUM НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС КРОВИ У КРЫС

**Н.С. Кавушевская, Л.Г. Тер-Аветикян,
Т.А. Синюкова, Л.В. Коваленко**

Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа — Югры Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

e-mail: kavushevskaya_ns@surgu.ru

Ключевые слова: плоды черники обыкновенной, плоды клюквы обыкновенной, плоды брусники обыкновенной, плоды голубики обыкновенной, полифенолы, антирадикальный эффект.

Целью работы явилась оценка влияния полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium* (черники обыкновенной, клюквы обыкновенной, брусники обыкновенной,

голубики обыкновенной) на уровень свободных радикалов *in vitro* и процессы антиоксидантной защиты *in vivo*.

Водно-спиртовые экстракты были получены из плодов черники, клюквы, брусники, голубики, собранных в Сургутском районе Ханты-Мансийского округа Тюменской области Российской Федерации.

Изменение концентрации свободных радикалов *in vitro* после введения экстрактов было определено в тестах: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) и ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid) [1]. Определено статистически значимое преимущество экстракта черники в ингибировании ABTS+ радикала.

PAT test использовали для оценки антиоксидантного потенциала плазмы крови на фоне введения экстрактов плодов рода *Vaccinium*. В наибольшей степени повышение антиоксидантной системы вызывают экстракты плодов голубики и черники.

Выраженность оксидативного гемолиза эритроцитов оценивали по реакции эритроцитов крыс на внесение в среду их инкубации H₂O₂ [2]. Факт снижения уровня гемолиза при воздействии H₂O₂ на мембраны эритроцитов крыс, предварительно получивших полифенолы плодов экстрактов, коррелирует с ранее описанным защитным эффектом эпигаллокатехин галлата (EGCG) на эритроциты человека (RBC) и молекулярные модели его мембраны [3,4]. Следует указать, что и EGCG и ресвератрол, в качестве компонентов, входят в состав всех исследуемых полифенольных экстрактов северных плодов. Это обстоятельство позволяет предполагать, что именно механизм стабилизации мембран, выявленный в экспериментах с EGCG и ресвератролом, лежит в основе цитопротекторного действия экстрактов плодов рода *Vaccinium*, обнаруженного в условиях нашего эксперимента.

Предполагается, что полифенольные экстракты плодов исследуемых растений имеют потенциал влияния на оксидативный статус крови ввиду наличия антирадикальных свойств и способности повышать уровень антиоксидантной защиты.

Литература:

1. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente [et al.]. Free Radical Biology and Medicine. — 1999. — Vol. 26. — P. 1231–1237.
2. Hawkins CL, Brown BE, Davies MJ Arch Biochem Biophys. 2001 Nov 15; 395(2). P.137–145.
3. Colina JR, Suwalsky M, Manrique-Moreno M, Petit K, Aguilar LF, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019 Jan 1;173. P.742–750.
4. Ungarala, Ramakrishna et al. Antioxidants (Basel, Switzerland). Vol. 11, 2, 294. 2022.

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА YAP1 В СТВОЛОВЫХ НИШАХ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Е.П. Калабушева, О.Л. Черкашина, Д.С. Аболин, О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк

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

e-mail: Kalabusheva.e@gmail.com

Ключевые слова: эпидермальные кератиноциты, дермальные фибробласты, YAP1, вертепорфин, дифференцировка.

Поддержание гомеостаза и стимуляция процессов регенерации кожи достигается путем реципрокных взаимодействий эпидермиса и дермы, реализуемых посредством активации сигнальных каскадов факторов

роста, цитокинов и молекул внеклеточного матрикса. Центральным звеном одного из таких сигнальных каскадов является белок YAP1. Активная форма YAP1 способна связываться с транскрипционными факторами и инициировать программы дифференцировки, пролиферации, фибротического или даже онкологического перерождения ткани. Мы исследовали экспрессию и активацию белка YAP1 в эпидермальных кератиноцитах и дермальных фибробластах и сделали предположение о вкладе этого сигнального пути в эпителио-мезенхимные взаимодействия кожи человека.

Иммуногистохимическое окрашивание выявило единичные клетки с активной ядерной формой белка YAP1 в базальном слое эпидермиса и папиллярной дерме. Эпидермальные кератиноциты исследовали на моделях 2D и 3D культивирования. В монослойной культуре выявили ингибирование сигнального пути YAP1 при формировании конфлуэнтного монослоя. На модели живого эквивалента кожи показали взаимосвязь между гиперактивацией YAP1 и гипертрофией базального слоя эпидермиса. Аналогичный паттерн наблюдали в процессе регенерации ксенотрансплантированного лоскута кожи человека.

Тотальная фракция фибробластов дермы кожи человека в монослойной культуре была гомогенна по экспрессии YAP1, однако при помещении в трехмерные условия — кожные органоиды — разделялась на две субпопуляции. PDGFR α -положительные клетки формировали центральное ядро органоида и не экспрессировали YAP1, в то же время CD26 и FAP-положительные клетки являлись центром активного сигналинга YAP1, стимулируя его экспрессию даже в прилегающих PDGFR α -клетках. В другой трехмерной модели культивирования при помещении в коллагеновый гель мы не наблюдали разделения фибробластов на субпопуляции. Ингибирование сигнального пути YAP1 посредством добавления вертепорфина также не приводило к клеточной сегрегации, однако препятствовало экспрессии сократительных белков и контракции коллагенового геля.

Наши результаты позволяют предположить существование специализированной субпопуляции фибробластов дермы, способной в некоторых условиях активировать сигнальный путь YAP1 в окружающих клетках. Подобная локальная активация может вносить вклад в поддержание пула стволовых клеток эпидермиса, а также стимулировать запуск посттравматической регенерации. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-30015.

ИЗУЧЕНИЕ МАРКЕРА И МЕДИАТОРА КЛЕТОЧНОЙ СЕНЕСЦЕНЦИИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СОСУДИСТЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе, Н.В. Короткова, А.А. Крылов, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Стрельникова, И.Ю. Суров, А.Д. Боженова, А.С. Захаров, Н.Д. Нозадзе

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Москва

e-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

Ключевые слова: клеточная сенесценция, PAI-1, культура HUVEC, ПТФЭ, ПЭТ, нитинол, сосудистые имплантаты.

Клеточная сенесценция (КС) играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, таких

как атеросклероз и структурные заболевания сердца. Ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor — 1, PAI-1), экспрессируемый преимущественно эндотелиоцитами, является одним из ключевых маркеров и медиаторов КС [1]. Влияние клеточной сенесценции на адаптацию нативного сосуда к имплантации сосудистых протезов и стентов остаётся не до конца изученным. Целью исследования служила оценка уровня и экспрессии PAI-1 в первичной культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) при воздействии основных материалов имплантатов, применяемых в сердечно-сосудистой хирургии (ССХ): политетрафторэтилена — ПТФЭ, полиэтилентерефталата — ПЭТ, никелид титана — нитинола.

Первичные культуры HUVEC, выделенные по протоколу Crampton S.P. (2007) [2], подвергались инкубации с ПТФЭ, ПЭТ и нитинолом в течение 24 часов, после чего проводилась оценка экспрессии PAI-1 в лизате культуры клеток при помощи метода Вестерн-блот с использованием первичных кроличьих поликлональных антител к PAI-1 PA598307 (Thermo Fisher) и уровня PAI-1 в кондиционной среде при помощи иммуно-ферментного анализа с использованием антител TC12075 (Technoclone).

Вестерн-блот показал пониженную экспрессию PAI-1 в первичной культуре HUVEC, инкубированной с нитинолом, по сравнению с контролем ($p=0,04$). Отмечалась повышенная экспрессия PAI-1 при инкубации культуры эндотелиоцитов с ПЭТ, однако межгрупповые различия не были статистически значимыми ($p>0,05$); статистически значимых межгрупповых различий при оценке экспрессии PAI-1 при инкубации культуры HUVEC с ПТФЭ выявлено не было ($p>0,05$).

Средние значения уровня PAI-1 в кондиционной среде составили 165,21 нг/мл (1,88, ДИ 95% 164,17–166,25) в группе контроля, 159,83 нг/мл (3,25, ДИ 95% 157,77–161,90) в группе ПЭТ, 166,33 нг/мл (2,39, ДИ 95% 165,00–167,65) в группе ПТФЭ и 165,06 нг/мл (2,23, ДИ 95% 163,82–166,30) в группе нитинола. Статистически значимые различия получены между группами контроля и ПЭТ ($p<0,001$).

Выводы: воздействие материалов сосудистых имплантатов характеризовалось пониженной экспрессией PAI-1 в первичной культуре HUVEC при воздействии нитинола и повышенной — при воздействии ПЭТ, однако при воздействии последнего повышения уровня PAI-1 в кондиционной среде не наблюдалось, что следует учитывать при *in vitro* и *in vivo* оценке адаптации нативного сосуда к сосудистым имплантатам.

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ТЕЧЕНИЕ АУТОФАГИИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

**А.П. Калинин¹, Е.С. Зубкова¹,
М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфёнова^{1,2}**

¹ ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

² ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: alexanderpkalinin@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, аутофагия, воспаление.

Одним из подходов в лечении заболеваний является клеточная терапия, самым широко используемым инструментом которой служат мезенхимальные стволовые

клетки (МСК), обладающие способностью контактным и паракринным образом воздействовать на регенеративные процессы, благодаря наличию широкого спектра мембранных рецепторов и секретируемых факторов. Наряду с множественными рецепторными, сигнальными, экспрессионными механизмами, обеспечивающими жизнеспособность и функционирование МСК, весьма важную роль в их жизнедеятельности играет аутофагия — высококонсервативный процесс, направленный на поддержание внутриклеточного гомеостаза посредством лизосомальной деградации различных макромолекул и органелл. Аутофагия является важным адаптационным механизмом клетки, поскольку обеспечивает её мономерами и макроэргами, необходимыми для синтеза новых жизненно важных молекул. Процессы аутофагии вовлечены в приспособление МСК к меняющимся условиям среды путём тонкой регуляции их дифференцирующего потенциала, секреторной и иммуномодулирующей активности, обеспечивающей жизненный цикл этих клеток. В условиях микроокружения, меняющегося при различных воздействиях, а также в процессе коммуникации с другими типами клеток, МСК могут изменять свой экспрессионный профиль и выполняемую ими функцию. Самым распространённым патологическим процессом можно считать воспалительную реакцию, сопровождающуюся образованием и высвобождением факторов, действие которых является частью стрессорного ответа.

В нашем исследовании мы разделили МСК на группы, которые по отдельности обрабатывали провоспалительными факторами, — липополисахаридом (ЛПС), фактором некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкином-17 (ИЛ-17), а также условно противовоспалительными факторами — полирибоинозиновой-полириботидиловой кислотой (P(I:C)) и интерлейкином 4 (ИЛ-4). В качестве группы сравнения использовали интактные МСК. С помощью проточной цитофлуориметрии, вестерн-блоттинга и ПЦР мы показали, что обработка МСК ФНО- α приводит к значимому увеличению экспрессии белка секвестросомы 1 (SQSTM1), главного адаптерного белка аутофагии. В МСК, обработанных ЛПС, усиливается активация белка лёгкой цепи 3 (MAP1LC3A), ключевого участника аутофагии. С помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентных зондов CytolD и дансил-кадаверина мы обнаружили усиление процесса аутофагии в МСК, поляризованных воспалительными факторами, и отсутствие такого усиления при противовоспалительной стимуляции клеток. Полученные данные, наряду с выявленными нами изменениями экспрессии про- и противовоспалительных факторов и цитокинов, дают возможность модулировать функции МСК путем воздействия на их микроокружение. Работа выполнена при поддержке гранта РФФН[№] 19-15-00384-П.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Ю.А. Калинина, Н.Н. Павличенко

ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: npavlichenko@alkorbio.ru

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, банк крови.

Сейчас все чаще как источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) рассматривается пуповинная кровь (ПК). Эти клетки имеют больший пролиферативный

потенциал по сравнению с ККМ, кроме того, их можно использовать аутологично [1,2].

К сожалению, до сих пор нет четкого понимания, какие факторы влияют на качество ПК. Нет и четких протоколов по транспортировке и обработке материала. Даже по поводу максимально допустимого времени от получения ПК до ее обработки нет единого мнения [3]. Так, сообщество NetCord и американская ассоциация банков крови (AABB) вообще не упоминают, в какой период кровь должна быть заморожена. FDA, FACT и US state of NY Dept. of Health устанавливают лимит в 48 часов. Для выработки стандартного протокола, позволяющего получить образцы максимального качества, требуется продолжать исследование этих вопросов.

Мы проанализировали 63 образца пуповинной крови, поступившей в коммерческий банк стволовых клеток «Транс-Технологии» (Санкт-Петербург) за 2021 и 2022 годы. Оценивали объем полученного образца, количество лейкоцитов и ГСК. Изучали наличие связи этих параметров с возрастом матери, полом и весом ребенка, сроком и типом родов (осложненные/неосложненные, естественные роды/кесарево сечение), а также времени от момента забора ПК до обработки образца.

Обнаружена сильная корреляция ($r=0,802$, $p < 0,001$) между объемом полученной ПК и количеством лейкоцитов в 1 мкл банкированного образца и корреляция средней силы ($r=0,54$, $p < 0,001$) между объемом образца и количеством ГСК в 1 мкл образца. Не обнаружено связи между количеством лейкоцитов и ГСК в 1 мкл образца, возрастом матери и сроком родов. Также не выявлено статистически значимой связи этих параметров с наличием осложнений при родах, путем родоразрешения (ЕР или КС) и полом ребенка. Корреляция количества лейкоцитов и ГСК с весом ребенка при рождении была статистически значимой, но слабой ($r=0,291$, $p = 0,022$ и $r=0,291$, $p = 0,022$, соответственно).

Все проанализированные образцы замораживались в течение 24 часов после забора ПК. В пределах этого временного отрезка корреляции между количеством лейкоцитов и ГСК в 1 мкл банкированного образца и временем, прошедшим от забора ПК до ее обработки не обнаружено ($r=0,122$, $p = 0,343$).

Литература:

1. Михайлова В.А. Инновации и технологии в биомедицине. Сборник материалов. 2019. С. 141.
2. Ballen K., Gluckman E., Broxmeyer H.E. Blood. 2013. Vol. 122. № 4. P.491.
3. Strobel J., Brenner L., Zimmerman R. Clin. Lab. 2015. Vol. 61. № 10. P. 1453.

MUSE — МЕТОД СРОЧНОЙ EX-VIVO МИКРОСКОПИИ

А.М. Калиниченко, Г.М. Денисенко, А.А. Земеров, А.Л. Файзуллин, П.С. Тимашев

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

e-mail: kalinichenko_a_m@student.sechenov.ru

Ключевые слова: цифровая патология, имплантация, микроскопия с возбуждением поверхности ультрафиолетом, MUSE, ex vivo микроскопия, трансляционная медицина, биофотоника.

Традиционная гистология основана на физическом секционировании замороженных или фиксированных

формалином и залитых в парафин (FFPE) фрагментов ткани. Поскольку метод FFPE является весьма долгим и трудоемким, есть необходимость в более быстром и простом методе ex-vivo микроскопии. MUSE — метод микроскопии, который работает на принципе возбуждения поверхности ткани ультрафиолетом [1]. Отличительной особенностью метода является то, что он не нуждается в стандартной гистологической подготовке, поскольку УФ проникает на несколько микрометров, а спектр возбуждения флуоресцентного красителя лежит в видимом спектре. Такой подход позволяет получить изображение, сопоставимое по информативности со стандартными методами микроскопии [2].

Благодаря проделанной нами работе, был составлен протокол окраски и подобран набор флуоресцентных красителей (растворы Hoechst и Нильского красного), которые позволяют в высоком качестве идентифицировать гистологические структуры ткани, не требуют специального оборудования, фиксации и занимают около 5 минут.

Поскольку результаты обладают высокой диагностической и прогностической значимостью, возможности традиционных патоморфологических исследований можно существенно расширить. Данный метод диагностики так же прим. м для оценки имплантируемых конструкций и срочной гистологической диагностики процесса регенерации тканей.

Литература:

1. Fereidouni F. et al. Nature Biomedical Engineering. 2017. № 12 (1). С. 957–966.
2. Qorbani A. et al. Journal of Cutaneous Pathology. 2018. № 7 (45). С. 498–503.

ДИНАМИКА ДЕГРАДАЦИИ РЕЦЕПТОРА ЭФР В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Р.С. Каменцева¹, М.В. Харченко¹, Г.В. Габдрахманова², М.А. Котов², Е.С. Корнилова^{1,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: rkamentseva@yandex.ru

Ключевые слова: рецептор эпидермального фактора роста, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, эндцитоз, деградация.

Считается, что пролиферация и дифференцировка мезенхимных стромальных клеток (МСК) находятся под контролем специфических для них сигнальных систем. Мы обнаружили, что МСК различного происхождения (из эндометрия, пульпы зуба, Вартонова студня и др.) экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (рЭФР) на высоком уровне, сравнимом с опухолевыми клетками эпителиального происхождения. При этом функционирование этой сигнальной системы в МСК практически не исследовано.

Рецептор ЭФР относится к семейству тирозинкиназных (ТК) рецепторов ErbB и имеет 7 лигандов [1]. Общеизвестна его роль в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза соматических клеток, а также участие в эмбриогенезе. В соответствии с принятой

моделью, после связывания с лигандом рЭФР димеризуется, что приводит к активации ТК, необходимой для стимуляции сигнальных каскадов. Активированный димер интернализуется в эндосомы. Здесь пути разных лиганд-рецепторных комплексов разделяются: комплексы с низкоафинными лигандами, такими как ТФР- α , при закислении эндосом диссоциируют, в результате чего рЭФР деактивируется и рециклирует обратно на ПМ, в то время как комплексы с высокоафинными лигандами, например, ЭФР, остаются стабильны вплоть до доставки в лизосомы, где они деградируют [2].

Целью данной работы было исследовать динамику эндоцитоза и деградации рЭФР под действием разных лигандов в МСК по сравнению с клетками карциномы линии HeLa. В исследовании использовали МСК, полученные из десквамированного эндометрия человека. Показано, что в отличие от клеток HeLa, более 80% интернализованного рЭФР попадает в эндосомы, не несущие маркер ранних эндосом EEA1, и остаются там в течение долгого времени вне зависимости от лиганда. Также проведен анализ деградации рЭФР с помощью ингибиторов лизосомального и протеосомного путей деградации, синтеза белка и ТК активности рЭФР. Если в HeLa деградация рЭФР происходит за 1–2 ч, то в энМСК рецептор деградирует в лизосомах не раньше, чем через 6 часов после добавления ЭФР или ТФР- α . Интересно, что в клетках HeLa уровень рецептора через 6 ч полностью восстанавливается за счёт синтеза белка *de novo*, тогда как в энМСК остается низким в течение как минимум 5 суток.

Таким образом, регуляция функционирования такой «конвенциональной» сигнальной системы, как система рЭФР, существенно различается в трансформированных соматических клетках и в МСК, используемых в качестве модели нормальных клеток. Возможно, что в МСК лиганд-зависимая деградация рЭФР может быть одним из необходимых этапов для перехода от стадии самообновления к программе дифференцировки. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10126).

Литература:

1. Singh B., Carpenter G., Coffey R.J. *F1000Research*. 2016 V. 5, P. 2270.
2. Kornilova E.S., Kamentseva R.S., Kharchenko M.V. in *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, 2022.

ПОИСК И УСТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, СОПРЯЖЕННЫХ С РАЗВИТИЕМ КОГНИТИВНЫХ И ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

**М.Н. Карагяур^{1,2}, А.Л. Примак¹, Е.А. Нейфельд¹,
Е.В. Семина^{1,2}, П.С. Климович¹, М.Н. Скрябина¹,
Л.М. Самоходская^{1,3}, В.С. Попов^{1,2}, С.С. Джауари¹,
Д.А. Шелег¹, Б.Д. Цыганков¹, В.А. Ткачук^{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

³ Медицинский научно-образовательный центр, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: m.karagaur@mail.ru

Ключевые слова: морфогенез, ЦЕС, урокиназный активатор плазминогена, полиморфизм.

Множество генеалогических и генетических исследований свидетельствуют в пользу наследственной природы ряда психических заболеваний. Часть генов, мутации в которых ассоциированы с развитием психических заболеваний и когнитивных нарушений, вовлечены в процессы морфогенеза головного мозга, что подтверждает прямую связь структуры головного мозга, а также процессов его закладки и развития с психическим здоровьем человека. Наоборот, повреждения в этих генах приводят к нарушению формирования структур головного мозга и, как следствие, могут приводить к развитию психических и когнитивных нарушений. Наследственные формы психических и когнитивных нарушений обычно характеризуются ранней манифестацией, быстрым прогрессированием, тяжелым течением и устойчивостью к терапии. В то же время, генетическая природа таких нарушений предполагает, что они могут быть диагностированы еще на доклиническом этапе (пренатальный скрининг, при трудоустройстве на объекты социального значения и на опасные производства, получение разрешения на владение оружием и т.п.), а своевременная психологическая и фармакологическая профилактика предположительно позволят отсрочить или предотвратить манифестацию психического заболевания. Все это подталкивает к необходимости поиска и идентификации этих факторов и их патологических вариантов.

В рамках выполнения данного исследования мы планируем идентифицировать характерные для российской популяции полиморфизмы генов PLAUR, PLAU, PLAT, CDH13, ADIPOQ и др. факторов, участвующих в развитии головного мозга, а также установить их взаимосвязь со временем манифестации и тяжестью течения неврологических и психических заболеваний на примере параноидной шизофрении (непрерывный и эпизодический тип) и эндогенной депрессии. Для идентификации геномных вариантов, ассоциированных с развитием когнитивных нарушений и распространенных в РФ, будет проведено полноэкзомное секвенирование генома пациентов, страдающих параноидной шизофренией и эндогенной депрессии (21 человек). Распространенность идентифицированных геномных вариантов, отличных от референсного генома, в группах лиц, страдающих шизофренией и депрессией, а также среди условно здоровых лиц будет оценена путем дополнительного скрининга. Полученные данные будут использованы в качестве основы для создания клеточных и животных моделей для установления функциональной значимости отдельных геномных вариантов в развитии психических и когнитивных нарушений.

Идентификация таких вариантов и установление механизмов их влияния на формирование мозга в перспективе может быть использовано для разработки подходов к пренатальной диагностике психических и когнитивных расстройств (создание генетических тест-систем), подходов к пренатальной/постнатальной этиотропной и патогенетической терапии (генная терапия, терапия некодирующими РНК) с целью нормализации процессов морфогенеза мозга и профилактики развития неврологических, когнитивных и психических расстройств. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00125.

**ЭФФЕКТЫ, ОБНАРУЖЕННЫЕ ПОД
ДЕЙСТВИЕМ ФНО α НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ
МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ
(ММСК) ЧЕЛОВЕКА, СХОЖИ С ЭФФЕКТАМИ
ДЕМЕТИЛИРОВАНИЯ АССОЦИИРОВАННОГО
СРG В ПРОМОТОРЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β
ММСК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

Д.В. Карпенко, А.И. Дорофеева, А.Е. Бигильдеев

ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России,
Москва, Россия

e-mail: d_@list.ru

Ключевые слова: ММСК человека, ФНО α , IL1B, ИФН- γ ,
СрG, NF-kB, метилирование, экспрессия IL1B.

ФНО α — один из ключевых регуляторов, ассоциирующийся с повреждениями, воспалительными процессами, и старением. В работе исследовали отклик ММСК костного мозга здоровых людей в ответ на ФНО α и другие стимулы. Было замечено значительное стимулирующее влияние воздействия ФНО α на экспрессию IL1B, являющегося одним из ростовых факторов стромальной ткани костного мозга, а также деметилирующее влияние ФНО α на СрG промотора IL1B в позиции -299 от старта транскрипции (СрG4). СрG4 расположен вблизи сайта связывания факторов транскрипции NF-kB, передающих сигнал от ФНО α и ИЛ-1 β . Изменения экспрессии и профиля метилирования схожи с данными многомерного однофакторного корреляционного анализа метилирования СрG4, полученными на ММСК человека, что дает основания предполагать их общую природу.

ММСК были получены из костного мозга здоровых доноров (n = 44) после подписания ими информированного согласия. Клетки культивировали в стандартных контрольных условиях или с добавлением одного из факторов: ФНО α , ИЛ-1 β или интерферона-гамма (ИФН- γ). ММСК также ко-культивировали в течение 4 дней с лимфоцитами (ЛЦ) от стороннего донора. Статус метилирования СрG в промоторе IL1B исследовали при помощи бисульфитной конверсии ДНК с последующей традиционной ПЦР и секвенированием суммарного ПЦР-продукта по Сэнгеру. Экспрессию IL1B измеряли методом RT-qPCR.

Культивирование ММСК (n = 6) в присутствии ФНО α приводит к повышению среднего уровня деметилирования СрG4 и экспрессии IL1B более чем в 100 раз. Отмена ФНО α не приводит к уменьшению деметилирования СрG4, но сопровождается частичным снижением экспрессии IL1B. Исследование метилирования СрG4 в контрольных образцах и изменения экспрессии IL1B в ММСК (n = 38) в ответ на различные стимулы показало, что увеличение экспрессии IL1B в ММСК происходит в ответ на ФНО α и при ко-культивировании с ЛЦ, но не в ответ на ИЛ-1 β или ИФН- γ . ММСК были разделены на две группы: с базовым уровнем деметилирования СрG4 <0,8 (Г1) и >0,9 (Г2). Базовый уровень экспрессии IL1B в Г2 в 5,3 раза больше, чем в Г1. Экспрессия IL1B в Г2 при любых экспериментальных условиях в 1,2–7,4 раз (медиана 2,6) больше, чем в Г1.

В ответ на ФНО α происходит деметилирование СрG4 и повышение экспрессии IL1B, а отмена ФНО α сопровождается частичным сохранением повышенной экспрессии IL1B при сохранении деметилированного статуса СрG4. Активация экспрессии IL1B в ММСК под действием ФНО α и ЛЦ происходит различным образом. Деметилирование СрG4 в IL1B связано с увеличением экспрессии этого гена в ММСК человека. Учитывая

митотическое наследование профиля метилирования ДНК и физиологическую роль ФНО α и ИЛ-1 β , можно предположить, что наблюдаемое различие в эпигенетическом маркере является долгосрочным отпечатком воспалительных процессов, перенесенных человеком ранее, а также маркером физиологических отличий стромы костного мозга человека. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04023.

**ВЗАИМОРЕГУЛЯЦИЯ СТВОЛОВЫХ
И ИММУННЫХ КЛЕТОК
В ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ
НИШАХ**

Д.В. Карпенко, А.Е. Бигильдеев

ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России,
Москва, Россия

e-mail: d_@list.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, раковые стволовые клетки, иммунные привилегии, Т-регуляторные клетки, ниша, аутоиммунитет, толерантность, покоящиеся стволовые клетки.

Эксперименты по трансплантации, которые стали возможны вследствие развития хирургии в начале XX века, показали существование особых иммунопривилегированных территорий, таких как мозг, глаз, плацента, семенники и хрящи. Первичные объяснения механизмов иммунных привилегий подразумевали наличие барьеров, препятствующих действию компонент иммунной системы. Более поздние работы показали не абсолютный характер таких барьеров и, более того, были продемонстрированы иммунные привилегии для индивидуальных стволовых клеток (СК) вне барьерных тканей, а именно, мышц, волосных фолликулов (кожи), кроветворных СК костного мозга. Недавно мы подтвердили иммунные привилегии мезенхимных СК костного мозга экспериментально, отметив важность ниш для функций СК [1]. Выводы, сделанные из этого эксперимента и из научной литературы, представлены ниже.

Полученные результаты укрепляют идею о том, что иммунные привилегии — базовое свойство покоящихся стволовых клеток. Известно также, что раковые СК имеют иммунные привилегии. Поскольку, несмотря на риски иммунные привилегии, СК не были исключены естественным отбором, есть веские основания, требующие их наличия. Основанием для таких особых взаимоотношений СК и иммунной системы может служить необходимость защиты СК и их дифференцированного потомства от аутоиммунных реакций.

Основной контроль над аутоиммунными реакциями осуществляется за счет отрицательной селекции лимфоцитов. Однако с течением времени вследствие приобретения мутаций может возникнуть расхождение между основным механизмом толерантности и антигенами, представленными на клетках периферических органов и тканей, достаточное для аутоиммунных реакций, что требует более точной настройки контроля аутоиммунитета. Предполагается роль СК в этом процессе. Подтверждением могут являться работы, в которых показано, что введение мезенхимных СК приводит к повышенной толерантности к аллогенным трансплантатам. По-видимому, обе системы (СК и адаптивный иммунитет) настолько важны для организма, что их тесное взаимодействие эволюционно обусловлено. Так, например, показано участие Т-регуляторных лимфоцитов в предоставлении

иммунных привилегий СК, влияние на поддержание стволового статуса клеток и удержание их в покоящемся состоянии и влияние на активацию СК при репаративном запросе. Показано, что T-регуляторные клетки нелимфоидных тканей по секретому и транскриптому напоминают стволовые клетки, что позволило выделить их в отдельный класс иммунных клеток стволовых ниш.

Суммарно можно говорить о значительном взаимном влиянии иммунной системы и СК, происходящем в стволовых нишах тканей взрослого организма. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00459.

Литература:

1. Karpenko D.V., Kapranov N.M., Bigildeev A.E., *Front Cell Dev Biol.* 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.993056.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САМОИНАКТИВИРУЮЩИХСЯ ЛЕНТИВИВЕКТОРОВ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ И РАЗМЕРА КЛЕТОЧНЫХ КЛОНОВ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ОЧАГОВ ЭКТОПИЧЕСКОГО КРОВЕТВОРЕНИЯ У МЫШЕЙ

Д.В. Карпенко¹, А.С. Артюхов², А.Е. Бигильдеев¹

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

e-mail: d_@list.ru

Ключевые слова: лентивирусный вектор, LeGO, МСК, сайт интеграции, индекс-хоппинг, КОЕф, маркирование клеток, очаг эктопического кроветворения.

Важным аспектом применения лентивирусных векторов для генной и клеточной терапии с генетически модифицированными клетками является понимание эффективности заражения различных видов клеток, особенно стволовых, а также информация о сайтах интеграции (СИ) провирусов. Это необходимо для оценки ассоциированных рисков. С другой стороны, лентивирусные векторы применяются для индивидуального маркирования различных популяций клеток и анализа клональной динамики в них. Однако клональное устройство некоторых типов тканей млекопитающих, в частности, стромы костного мозга (КМ), до сих пор остается недостаточно изученным. Продвижение в этом направлении позволит более эффективно применять регенеративный потенциал мезенхимных стволовых клеток (МСК) для восполнения ими функций органов и тканей.

Стромальный подслои длительной культуры костного мозга декостеронового типа (ДККМ) мыши ($n = 10$) трансдуцировали самоинактивирующимся лентивирусным вектором 3 поколения системы LeGO на основе HIV-1. Трансдуцированные ДККМ имплантировали под капсулу почки сингенным реципиентам. В очагах эктопического кроветворения (ОЭК), полученных спустя 42 дня, исследовали содержание колониеобразующих единиц фибробластных (КОЕф), эффективность маркирования ДККМ и КОЕф. СИ в ОЭК изучали с помощью NGS на Illumina MiSeq. Биоинформатический анализ проводили алгоритмом, разработанным авторами на языке Python. Картирование СИ выполняли NCBI BLAST.

Несмотря на высокую эффективность заражения ДККМ, ни одна из 309 КОЕф, полученных из 10 ОЭК, не была маркирована, по данным цифровой капельной ПЦР. NGS-анализ показал, что крупных маркированных клонов (40–100 клеток), было всего 10 из 2165 среди всех образцов. Следовательно, клетки с высоким пролиферативным потенциалом не были эффективно заражены. Значит, регистрируемые маркированные клетки — это не стволовые стромальные клетки, которые переживают процедуру первичной имплантации. Их доля от всех стромальных клеток ОЭК оценивается в 30% (диапазон значений 5–72%). Картирование СИ показало, что они распределены по всему геному мыши, с небольшими предпочтениями к генам. Отмечено, что индекс-хоппинг — серьезное препятствие для анализа амплифицированных библиотек.

В подслое ДККМ эффективность заражения МСК заметно ниже, чем КОЕф и более дифференцированных стромальных клеток. Это может быть обусловлено совокупностью молекулярных процессов, которые определяют стволовой статус клетки. Это подразумевает, что эффективность генной терапии, основанной на подобных лентивирусных векторах, может быть ограничена и определяется, в основном, временем жизни зараженных не стволовых клеток. С другой стороны, это означает сниженную вероятность нарушения функций стволовых клеток.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА КРЫСАХ

Е.К. Карсунцева, А.Д. Воронова, С.С. Андрецова, А.В. Чадин, Г.А. Фурса, О.В. Степанова, В.П. Чехонин

ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: katty.karsunceva@gmail.com

Ключевые слова: моделирование болезни Альцгеймера, бета-амилоид, тесты открытого поля, тест на пассивное избегание, водный лабиринт Морриса.

Болезнь Альцгеймера (БА) на сегодняшний день является тяжелейшим нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся прогрессирующей потерей памяти и дезориентацией в пространстве [1]. БА затрагивает население старше 65 лет, и после диагностирования заболевания средняя продолжительность жизни пациентов составляет всего 7 лет. Существующие подходы к лечению способствуют лишь замедлению нейродегенерации, однако не приводят к выздоровлению пациентов. Таким образом, поиск эффективной терапии БА остается важнейшей задачей нейробиологии. Для оценки различных стратегий лечения необходимы экспериментальные и доклинические исследования, в которых большая роль отводится изучению поведенческих реакций у лабораторных животных. На данный момент существует множество протоколов для моделирования болезни Альцгеймера, однако все они имеют свои недостатки [2]. Таким образом, целью данного исследования было разработать оптимальную модель болезни Альцгеймера на крысах и провести ее валидацию с помощью поведенческих тестов.

В исследовании были использованы самцы ($n=16$) и самки ($n=16$) линии Вистар в возрасте 6 месяцев. Синтетический бета-амилоид (2,5 нмоль) вводили по 5 мкл в оба полушария в область гиппокампа. Для

сравнения были использованы интактные крысы и животные, которым вводили PBS в объеме 5 мкл. Для валидации модели болезни Альцгеймера были проведены следующие тесты: открытое поле, узнавание предметов, У-лабиринт, пассивное избегание и водный лабиринт Морриса. Тесты проводили через 4 недели после введения бета-амилоида в течение последующих 4 недель. Для оценки и обработки данных, полученных после тестов, проводили статистический анализ в программах GraphPad Prism 8.

У животных, которым вводили бета-амилоид, были выявлены значимые ухудшения показателей в У-лабиринте и водном лабиринте Морриса, тогда как в группах сравнения не наблюдалось каких-либо нарушений. Полученные результаты могут свидетельствовать о потере интереса у животных, нарушении памяти и дезориентации в пространстве. Эти процессы являются основными симптомами БА, наблюдаемыми у пациентов.

В большинстве работ моделирование БА проводят только на самцах, тогда как в своем исследовании мы использовали крыс обоих полов. Это является значимым преимуществом нашей модели, так как БА подвержены как мужчины, так и женщины. Таким образом, нами была успешно оптимизирована и валидизирована модель болезни Альцгеймера на крысах с помощью поведенческих тестов. Данная модель может быть рекомендована для дальнейшего изучения терапевтических препаратов при лечении болезни Альцгеймера. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00141.

Литература:

1. Solis E Jr., Hascup K.N., Hascup E.R. J. *Alzheimers Dis.* 2020. V. 76. N. 4. P. 1179–1198.
2. Drummond E., Wisniewski T. *Acta Neuropathol.* 2017 Feb. V. 133. N. 2. P. 155–175.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТОВ ИНГИБИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА NOTCH НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ

**Н.В. Католикова^{1,2}, Д.Д. Шафранская³,
А.Д. Пржибельский³, Р.Р. Гайнетдинов^{1,4},
А.Б. Малашичева^{2,5}**

¹ Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Центр алгоритмической биотехнологии, Санкт-Петербургский Институт Трансляционной Биомедицины, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, Санкт-Петербургский государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nkatolikova@yandex.ru

Ключевые слова: Notch сигналинг, дофаминергические нейроны, дифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека.

Notch сигналинг играет важнейшую роль в развитии нервной системы. В эмбриональном периоде белки Notch сигнального пути принимают участие в регуляции клеточной миграции, контроле баланса между самообновлением и дифференцировкой клеток, поддерживают рост аксонов и дендритов, а также вносят вклад в регуляцию синаптической пластичности. Постнатально Notch сигнальный каскад важен для поддержания пула стволовых клеток, регуляции пролиферации и дифференцировки, функционирования зон взрослого нейрогенеза, а также имеет решающее значение для активации латентных нейрогенных программ.

При нейрональной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток белки сигнального каскада Notch необходимы для роста нейронов и играют роль в спецификации и регионализации дифференцирующихся клеток [1]. Однако эффекты от влияния на Notch сигналинг variabelны и сильно зависят от клеточного контекста и состояния других сигнальных каскадов, с эффекторами которых взаимодействуют белки Notch [2].

В нашей работе мы провели оценку эффекта ингибирования Notch сигналинга во время дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК) в дофаминергические нейроны и сделали сравнение между ингибированием Notch с помощью короткой шпилечной РНК (shRNA) к гену эффекторного белка Notch RBPJ-k и ингибитором гамма-секретазы DAPT. Для анализа были использованы транскриптомные профили клеток, полученные на 7-й день дифференцировки.

Мы не обнаружили достоверных различий между клетками контрольной дифференцировки и дифференцировки в условиях ингибирования Notch сигналинга с помощью shRNA к RBPJ-k. Вероятнее всего, полученные данные свидетельствуют о том, что индукция дифференцировки в нейрональном направлении сама по себе приводит к ингибированию Notch сигналинга и дополнительное ингибирование не оказывает выраженного эффекта. В то же время мы обнаружили, что хотя ингибирование Notch с помощью DAPT имеет много общих эффектов по сравнению с более специфичным ингибированием Notch с помощью shRNA к RBPJ-k, между этими двумя воздействиями есть достоверные различия. Применение DAPT приводит к более выраженной активации SHH-сигналинга, играющего важную роль в направлении дифференцировки иПСК, а также к изменению спектра экспрессируемых рецепторов. Кроме того, эти клетки в большей степени экспрессируют DEPTOR, что приводит к снижению активности mTOR сигналинга по сравнению с клетками, в которых ингибирование Notch было выполнено с помощью shRNA к гену RBPJ-k. Работа выполнена за счет средств гранта НШ-4664.2022.1.4.

Литература:

1. Tieng, V. et al. *Stem Cells Dev.* 23, 1535–1547. 2014.
2. Qi, Y. et al. *Nat. Biotechnol.* 35, 154–163. 2017.

ПРОТЕОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, СЕКРЕТОМА И КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ МСК И ВОЗДЕЙСТВИИ GDF11

**Д.Н. Каширина, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный,
И.М. Ларина, Л.Б. Буравкова**

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

e-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, протеом, клеточное старение, внеклеточный матрикс, секретом.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются многообещающими кандидатами для клеточной терапии. Терапевтический потенциал МСК в отношении восстановления тканей и заживления ран основан не только на их паракринных эффектах, но и на продукции внеклеточного матрикса (ВКМ), регулирующего функциональную активность клеток. Однако потенциал регенерации с возрастом снижается. Одним из способов модуляции регуляторных функций МСК может быть применение геропротекторных цитокинов, таких как GDF11. Чтобы выяснить механизмы старения МСК, а также возможность модуляции свойств сенесцентных МСК цитокином GDF11, изучали протеомные изменения как самих клеток МСК, так и изменения ВКМ и секретируемых белков.

Сенесцентные МСК (линия ASC52telo) получали методом стресс-индуцированного старения с помощью митомицина С (МмС). Параллельно в аналогичных условиях культивировали МСК, не подвергшиеся воздействию МмС. Также на этом этапе к половине клеток в каждой группе добавляли рекомбинантный белок GDF11 (Abcam, США) в концентрации 10 нг/мл и культивировали в течение 10 дней. Затем отдельно анализировали белки клеток, белки кондиционированной среды (секретом), а также белки ВКМ, полученного путем децеллюляризации. Протеомный анализ проводили методом жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии на основе системы нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США) и масс-спектрометра TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, США).

У сенесцентных МСК в лизате выявлено повышение содержания белков, для которых характерно участие в ответе на стресс и тепловой шок, метаболизме белков, регуляции сигналинга апоптоза и др. процессах, регулируемых IL1B, CDKN1, MMP3, GDF15, PLAUR, FAS. Одновременно снижались уровни белков, участвующих в митозе, экспрессии генов, процессинге РНК, метаболических процессах соединений азота и в регуляции внеклеточного матрикса.

В ВКМ и секретоме МмС+ клеток обнаружено повышенное содержание белков каскада комплемента и коагуляции (PAI1, PAI2, VTN, FGB, A2M), при этом снижены уровни коллагенов I и VI типов (COL1A1, COL1A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3), а также регуляторные и адгезионные гликопротеины FBLN1, HTRA1, LGALS1, TGFBI. Особого внимания заслуживает отрицательный регулятор сигнального пути рецептора гормона роста — GDF15, уровень которого был повышен в образцах как лизата МСК, так и ВКМ и секретоме МмС+ клеток.

Добавление в среду культивирования GDF11 приводило к повышению уровня фактора роста гепатомы (HDGF), а также активатора фактора роста гепатоцитов (HGFA) в клетках, а в секретоме увеличивался уровень простаглицинсинтазы (PTGIS) — мощного медиатора вазодилатации и ингибитора агрегации тромбоцитов. Обнаруженные белки могут быть ключевыми регуляторами действия GDF11. В целом, GDF11 не оказывал влияния на белки, ассоциированные с клеточным старением. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-75-10117.

ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ В ОЦЕНКЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПОКРЫТИЙ ИЗ ОКСИНИТРИДОВ ТИТАНА, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ РЕАКТИВНОГО МАГНЕТРОННОГО РАСПЫЛЕНИЯ

И.И. Ким^{1,2}, **М.А. Суровцева**^{1,2}, **Н.А. Бондаренко**^{1,2}, **А.П. Лыков**¹, **О.В. Повещенко**^{1,2}, **Е.В. Чепелева**^{1,2}, **И.Ю. Журавлева**², **А.А. Алишевская**³

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России

³ ООО «НИЦ Биостатистики и Клинических исследований», Новосибирск, Россия

e-mail: kii5@yandex.ru

Ключевые слова: интегральный показатель, нитинол, оксинитрид титана, биосовместимость, NO, EA.hy926, жизнеспособность.

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной заболеваемости и смертности населения. Эффективным подходом к коррекции ИБС является коронарная ангиопластика, заключающаяся в установке стента. Большое распространение получили стенты с лекарственным покрытием. Однако в отдаленные сроки после их установки на фоне длительно развивающихся рестенозов формируются тромбы. В связи с этим в последнее время вырос интерес к биоинертным покрытиям из оксидов и оксинитридов титана. Титанооксидные пленки улучшают био- и гемосовместимость металлической подложки.

В данной работе изучали образцы с покрытиями TiON с различным соотношением N₂ к O₂, нанесенных с помощью реактивного магнетронного распыления на подложки из медицинского нитинола (NiTi, 8×8×0,5 мм), время экспозиции — 45 мин.: контроль (NiTi); № 1 (TiO₂, U=100 V); № 2 (TiO₂, U=0); № 3 (Ti-O-N, U=-100 V, N/O — 1/1); № 4 (Ti-O-N, U=0, N/O — 1/1); № 5 (Ti-O-N, U=-100 V, N/O — 2/1); № 6 (Ti-O-N, U=0, N/O — 2/1); № 7 (Ti-O-N, U=-100 V, N/O — 3/1); № 8 (Ti-O-N, U=0, N/O — 3/1). Оценивали влияние этих покрытий на цитотоксичность, адгезию, жизнеспособность и продукцию NO клетками эндотелиальной линии EA.hy926. Цитотоксичность определяли в МТТ тесте после экспозиции образцов на клетках. Количество адгезированных клеток, живых и находящихся в фазах апоптоза и некроза, подсчитывали на 1 мм² после окрашивания образцов с клетками акридинным оранжевым и этидиум бромидом. Продукцию NO определяли с помощью реактива Грисса.

В результате было показано, что наименьшую цитотоксичность продемонстрировал образец № 2, наибольшую адгезию — образец № 4, наибольшую жизнеспособность — № 5, и наибольшую продукцию NO — образец № 8.

В связи с неоднозначностью полученных данных нами был введен интегральный показатель для определения наиболее биосовместимого покрытия. Для этого для каждой из 4 групп измеряемых показателей были установлены следующие пограничные значения и присвоены баллы: нижний допустимый уровень (0 баллов), приемлемый диапазон значений (1 балл), оптимальный уровень (2 балла). В каждой серии экспериментов каждому результату был присвоен соответствующий балл и было рассчитано среднее значение. Интегральный показатель рассчитывался для каждого покрытия по формуле:

II (integral indicator) = Mean score (MS, cytotoxicity) + MS (adhesion) + MS (viability) + MS (NO production)

Максимальное значение интегрального показателя составляло 8 баллов, минимальное — 0 баллов. Покрытие считалось оптимальным для использования при значении II не менее 4,8 баллов (60% значений во всех тестах выше оптимального уровня) и покрытие считалось приемлемым для использования при значении II не менее 3,2 баллов (80% значений во всех тестах выше допустимого уровня).

В результате определения интегрального показателя биосовместимости покрытий было показано, что наиболее оптимальным по функциональным свойствам для использования является образец № 2.

СОЗДАНИЕ ТКАНЕВОГО ЭКВИВАЛЕНТА ХРЯЦА НА ОСНОВЕ МАТРИЦЫ ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МИКРОНИЗИРОВАННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЦА СВИНЬИ

А.Д. Кириллова, Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов

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

e-mail: sashak1994@mail.ru

Ключевые слова: децеллюляризация, микрочастицы, хрящевая ткань, тканевая инженерия.

Перспективным терапевтическим решением проблемы восстановления структуры и функций поврежденной хрящевой ткани являются технологии малоинвазивного внутрисуставного введения клеточно-инженерных конструкций (КИК), состоящих из биосовместимых матриц, клеток и биоактивных молекул. Многообещающими выглядят матрицы из децеллюляризованных тканей, способные не только удерживать клетки в месте повреждения хряща, но и обеспечивать им необходимые для жизнедеятельности условия [1]. Цель — разработать тканевый эквивалент хряща на основе тканеспецифической матрицы из децеллюляризованного микронизированного суставного хряща свиньи (ДМСХс). Материалы и методы. Были разработаны три способа децеллюляризации микрочастиц хряща со средним размером 161 ± 11 мкм. Способ 1 — 3 цикла замораживания/оттаивания ($+37^\circ\text{C}/-196^\circ\text{C}$), обработка поверхностно-активными веществами (ПАВ) (Triton X-100 и додецилсульфат натрия), инкубация в ДНКазе I типа; способ 2 — обработка ПАВ, инкубация в ДНКазе I типа, обработка в среде сверхкритического CO_2 с добавлением 10% этанола; способ 3 — обработка ПАВ, обработка ультразвуком (УЗ), инкубация в ДНКазе I типа. Биохимический анализ тканеспецифических матриц включал определение содержания ДНК, гликозаминогликанов (ГАГ) и коллагена. Морфологию ДМСХс оценивали гистологическими методами окрашивания. Биологическую безопасность исследовали *in vitro* и *in vivo*. Функциональную активность *in vitro* определяли по способности матрицы поддерживать адгезию, пролиферацию и специфическую активность мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Результаты исследования. Децеллюляризация хрящевой ткани последовательно обработкой ПАВ, УЗ и ДНКазой I типа позволила достичь снижения количества ДНК на 95% с наибольшим сохранением ГАГ (37%) и коллагена (82%), по сравнению

с другими способами. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказана биологическая безопасность матрицы из ДМСХс. На культуре МСК ЖТч показана способность матрицы поддерживать высокий уровень пролиферации и хондрогенную дифференцировку, проявляющуюся в способности клеток нарабатывать ГАГ и коллаген II типа. Выводы. Разработанный оптимальный способ получения тканеспецифической матрицы на основе ДМСХс дает возможность перейти к разработке технологий создания из КИК тканевых эквивалентов хряща для регенеративной медицины.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.

Литература:

1. Sevastianov V.I., Basok Y.B., Kirsanova L.A. et al. Life (Basel). 2021. V. 11. № 8. P. 756.

КРИОХРАНЕНИЕ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КАК СПОСОБ СОХРАНИТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХОНДРОЦИТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Е.В. Киселева¹, Е.В. Батухтина^{2,3}, А.В. Ляндуп²

¹ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ «SeedBio», Москва, Россия

e-mail: evkiseleva@mail.ru

Ключевые слова: криоконсервация, хрящевая ткань, хондроцит, хрящевой эквивалент.

Ограниченная способность хрящевой ткани к регенерации является проблемой при проведении реконструктивных операций лицевого скелета, верхних дыхательных путей, суставных поверхностей. Возможность выделять и культивировать *in vitro* хондроциты из биопсийного материала способствует развитию тканевой инженерии и клеточных технологий реконструкции хрящевой ткани. Однако при монослойном культивировании хондроциты человека быстро теряют свои фенотипические характеристики: снижается экспрессия хондрогенных генов, таких как коллаген 2 типа, агрекан и др) и увеличивается экспрессия маркеров дедифференцировки (коллагена 1 и 3 типа и др), что является значительным ограничением для существующих регенеративных терапевтических подходов. Дедифференцированные хондроциты способны редифференцироваться, например, при культивировании в гипоксических и/или 3D условиях, и/или при использовании индукторов хондрогенной дифференцировки (TGF- β , IGF, BMP-2 и др), но с увеличением времени культивирования эта способность значительно снижается. Мы исследовали возможность криоконсервации и длительного хранения биопсийного материала хрящевой ткани для сохранения фенотипических характеристик выделяемых хондроцитов и создания хрящевого эквивалента.

Хрящевую ткань делили на кусочки, которые подвергались криоконсервации и хранились при -80°C в течение 2, 4 и 6 мес. После хранения оценивали жизнеспособность хрящевой ткани, эффективность выделения хондроцитов в культуру, скорость роста и способность культивированных хондроцитов образовывать хрящевой эквивалент.

В качестве контроля использовали не подвергавшийся хранению кусочек хряща, из которого выделяли хондроциты, из них создавали хрящевой эквивалент. На 1 пассаже часть клеток была криоконсервирована. Эти клетки использовали для сравнения эффективности образования хрящевого эквивалента после криоконсервации.

Криоконсервация хрящевой ткани и хранение при -80°C в течение 2, 4 месяцев не влияли значимо на жизнеспособность хрящевой ткани, количество выделяемых хондроцитов, скорость их пролиферации, экспрессию специфических белков внеклеточного матрикса хряща. Хранение при -80°C в течение 6 месяцев снижало жизнеспособность хрящевой ткани в среднем на 10,7%, но не влияло на характеристики выделенных в культуру хондроцитов. Эффективность формирования хрящевого эквивалента значимо не отличалась от контроля и составила 85,7%. Подвергшиеся криоконсервации хондроциты были способны формировать хрящевой эквивалент только в 40% случаев.

Наши результаты показывают, что криоконсервация хрящевой ткани может сохранить фенотипические характеристики выделяемых хондроцитов для последующего использования в клеточной терапии и/или тканевой инженерии.

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДА CAR-T ТЕРАПИИ PЭА-ПОЗИТИВНЫХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Я.Ю. Киселева¹, Т.М. Кулинич¹, Е.А. Кудинова¹, А.М. Шишкин¹, О.Б. Большакова¹, Ю.С. Лебедин², В.К. Боженко¹

¹ *Лаборатория онкоцитологии и экспериментальной терапии опухолей, ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России, Москва, Россия*

² *ООО «ХЕМА», Москва, Россия*

e-mail: vbojenko@mail.ru

Ключевые слова: CAR-T, иммунотерапия, химерный T-клеточный рецептор, раково-эмбриональный антиген (PЭА), плаزمиды.

Современная CAR-T терапия основана на введении в организм пациента аутологичных T-лимфоцитов, модифицированных ex vivo методами геной инженерии, полученные лимфоциты экспрессируют на своей поверхности искусственный специфический рецептор (chimeric antigen receptor, CAR). В настоящее время метод CAR-T терапии более широко используется в отношении гемобластозов, хотя адаптация его для лечения солидных опухолей рассматривается как перспективное направление иммунотерапии. Для доставки плазмиды, кодирующей CAR, в T-лимфоциты широко используется высокоэффективная ленти-/ретровирусная трансдукция, при которой из-за интеграции нового генетического материала в геном клетки существует вероятность инсерционного мутагенеза и активации онкогенов. Альтернативным методом доставки CAR-плазмиды в клетки является нуклеофекция, которая позволяет проникнуть генетическому материалу непосредственно в ядро и запустить экспрессию CAR в течение нескольких часов, нуклеофекция более безопасна, поскольку плаزمиды не интегрируются в геном, а экспрессия CAR временна и обратима, что минимизирует риск последующих осложнений. Мы использовали данный подход при разработке собственного CAR-T продукта — препарата

«Карплазмин», представляющего собой лимфоциты, несущие в ядре ДНК-плазмиду CAR третьего поколения и экспрессирующие на своей поверхности химерные рецепторы против PЭА (раково-эмбриональный антиген).

Противоопухолевая активность и специфичность «Карплазмиды» была доказана в доклинических исследованиях в условиях in vitro и in vivo. В качестве моделей in vitro использованы PЭА+ клетки линий HT-29 и HCT-116 (аденокарцинома толстой кишки человека) и PЭА– клетки линии HEK293 (эмбриональная почка человека). Исследования in vivo проведены с использованием ксенографтных моделей опухолей HT-29 перевитых мышам BALB/c Nude. Кроме того, нами была изучена фармакокинетика препарата «Карплазмин» при введении его мышам B6D2F1.

Эксперименты in vitro показали специфическое ингибирование роста популяций клеток HT-29 и HCT-116 при со-культивировании их с «Карплазмином». В исследованиях in vivo «Карплазмин» демонстрировал выраженное противоопухолевое воздействие: семь еженедельных введений препарата мышам с ксенографтными опухолями из клеток HT-29 оказали выраженный противоопухолевый эффект — 80% животных в экспериментальной группе выжило при 100% гибели в контрольной (без лечения). При этом у 40% мышей наблюдалась полная ремиссия без признаков определяемой опухоли. Исследование фармакокинетики показало, что «Карплазмин» способен циркулировать в крови до двух недель (период полувыведения 105 ± 7 ч), также были определены параметры его распределения в тканях организма.

Результаты доклинических исследований демонстрируют, что «Карплазмин» является перспективным иммунотерапевтическим препаратом для лечения PЭА-позитивных опухолей.

МОДЕЛЬ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЗОНЕ ПЕНУМБРЫ

Е.Н. Кислухина¹, Н.В. Лизунова^{1,2}, А.М. Сурин^{1,3}, З.В. Бакаева¹, В.Г. Пинелис¹

¹ *ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия*

² *ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия*

e-mail: Kislukhina.EN@ya.ru

Ключевые слова: ишемический инсульт, некротическое ядро, пенумбра, глутаматная эксайтотоксичность, широкая оптическая нейровизуализация, GCaMP, кальциевый имиджинг.

Ишемический инсульт занимает четвертое место среди причин смертности во всем мире [1]. При инсульте формируется первичный очаг некроза и окружающая его зона пенумбры с измененным метаболизмом. Предотвращение гибели клеток в данной области является целью терапевтических воздействий [2]. С недавних пор для изучения патофизиологии инсульта стали применять метод широкой оптической нейровизуализации (ШОН) [3].

В данной работе были использованы мыши линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (Jackson Laboratory), экспрессирующие в нейронах флуоресцентный сенсор Ca^{2+} GCaMP6f. Животных подвергли операции по установке краниального окна, что позволило наблюдать активность коры больших полушарий у бодрствующих

животных [4]. Через 4 недели у группы Фототромбоз (ФТ, $n = 9$) вызывали фотоиндуцированную ишемию головного мозга (бенгальский розовый 20 мг/кг, 6,7 мг/мл, в/в; лазер 532 нм, 10 мВт, 10 мин; $\phi = 2$ мм; $AP = -1$; $ML = -2$) [5]. Группе Контроль (КТРЛ, $n = 9$) бенгальский розовый не вводили. Активность мозга записывали методом ШОН за 2–4 д до ФТ, через 3 мин, 24 ч и 7 д после ФТ (кальций: возбуждение 470 нм, эмиссия 530 нм, 20 Гц; гемодинамика: светорассеяние 505 нм, 20 Гц).

У группы КТРЛ не обнаружено изменений активности мозга. В группе ФТ наблюдали волну деполяризации, сопровождающуюся вазоспазмом. В очаге ишемического повреждения резко усиливалась флуоресценция сенсора, что можно интерпретировать как резкое повышение внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и разрушение клеток с вытеканием сенсора во внеклеточную среду. Наблюдалось увеличение размера зоны с высокой $[Ca^{2+}]_i$ в первые минуты после ишемии (ср. арифм. \pm ст. ош. ср.: $1,14 \pm 0,34$ мм² и $1,34 \pm 0,32$ мм² через 3 и 10 мин соответственно) и значительное ее увеличение через 24 ч ($6,03 \pm 0,82$ мм², $p < 0,05$). Через 7 д интенсивность флуоресценции GCaMP6f в зоне повреждения оставалась повышенной, однако яркость свечения и площадь области уменьшалась относительно 24 ч после ФТ ($1,69 \pm 0,19$ мм², $p < 0,05$).

Таким образом, модель фотоиндуцированной ишемии позволила сформировать зону пенумбры площадью ($4,70 \pm 0,60$ мм²) с заданной локализацией. Метод ШОН позволяет проследить динамические изменения размеров поврежденной области, что дальнейшим может быть использовано для изучения влияния терапевтических подходов.

Литература:

1. Roth G.A., Abate D., Abate K.H., et al. The Lancet. 2018. V. 392. № 10159. P. 1736–1788.
2. Yi Y, Liu Z, Wang M, Sun, M., et al. Curr Neurovasc Res. 2021. V. 18. № 5. P. 572–585.
3. Zhao H.T., Tuohy M.C., Chow D. et al. Cell Reports. 2021. V. 37. I. 1. Art. № 109794.
4. Silasi G, Xiao D, Vanni MP., et al. J Neurosci Methods. 2016. V. 267. P. 141–149.
5. Galkov M, Gulyaev M, Kiseleva E, et al. J Neurosci Methods. 2020. V. 329. № 1. Art. № 108457.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЗАГРУЖЕННЫХ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИГЕНАМИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК IN VITRO

К.В. Китаева, И.Ю. Филин, А.В. Городилова, Ю.П. Маясин, Ч.Б. Харисова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов

Казанский Федеральный (Приволжский) Университет, Казань, Россия

e-mail: kitaeva.kristina.v@gmail.com

Ключевые слова: иммунотерапия, онкология, дендритные клетки, мембранные везикулы, дендритная вакцина.

Терапевтические вакцины на основе дендритных клеток (ДК) являются многообещающим методом адьювантной иммунотерапии, благодаря минимальным побочным эффектам и долговременной модуляции противоопухолевого иммунного ответа. Целью исследования стала оценка противоопухолевого эффекта ДК, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), загруженных опухоль-специфическими антигенами (ОСА).

МКПК выделяли в градиенте плотности фиколла, полученные клетки культивировали в питательной среде RPMI, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин и смесь пенициллина-стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Направленную дифференцировку МКПК проводили в течение 7 дней с использованием факторов IL-4, GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE 2. Для оценки эффективности дифференцировки проведена оценка экспрессии поверхностных CD-маркеров (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD64, HLA-DR, CD3, CD19, CD20, CD56) при помощи проточной цитофлуориметрии. В качестве ОСА использовали лизат опухолевых клеток меланомы человека линии M14 (лизат-M14), а также индуцированные цитохалазином В мембранные везикулы (иМВ-M14), выделенные из нативных и генетически модифицированных клеток M14 со сверхэкспрессией GM-CSF (иМВ-GM-CSF-M14). Загруженные ОСА ДК добавляли к нативным МКПК и совместно инкубировали в течение 48 часов для оценки активации Т-киллеров, после чего оценивали цитотоксическую активность Т-киллеров при помощи теста на апоптоз после инкубации с ДК на культуре опухолевых клеток M14.

Нами было показано, что полученные в результате направленной дифференцировки МКПК обладали фенотипом ДК (CD11c⁺CD80⁺CD83⁺CD86⁺CD64⁺HLA-DR⁺CD3⁺CD19⁺CD20⁺CD56⁻). Загруженные опухолевыми антигенами ДК приводили к увеличению активированных Т-киллеров в культуре МКПК: после инкубации с ДК+лизат-M14 на 32,6%, после ДК+иМВ-M14 на 27,6%, после ДК+иМВ-GM-CSF-M14 на 32,5%. При этом было показано, что после добавления МКПК+ДК+лизат-M14 в культуру клеток M14 число жизнеспособных клеток снижалось на 18,6%, а при добавлении МКПК+ДК+иМВ-M14 или МКПК+ДК+иМВ-GM-CSF-M14 на 26,1% и 24,6%, соответственно, относительно нативных клеток M14.

Таким образом, нами показано, что ДК, полученные из МКПК путем направленной дифференцировки цитокинами и загруженные различными видами ОСА, обладают иммуномодулирующей активностью, которая увеличивает цитотоксический потенциал Т-киллеров в культуре МКПК против клеток меланомы. Данное исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет гранта Российского научного фонда 22-24-20018.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ

С.К. Клетухина, М.О. Гомзикова

НИЛ «Межклеточная коммуникация», Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: sevindzh.rasulova.1993@mail.ru

Ключевые слова: микровезикулы, мезенхимные стволовые клетки, терапевтический агент, регенеративная медицина.

В настоящее время микровезикулы клеток человека привлекают к себе повышенное внимание исследователей и медиков во всем мире. Микровезикулы (МВ) — это окруженные цитоплазматической мембраной округлые структуры, которые содержат цитоплазматическое содержимое родительской клетки и обладают размером 50–2000 нм. Использование МВ мезенхимных стволовых клеток в регенеративной медицине в качестве терапевтических агентов и векторов доставки лекарственных

средств вызывает большой интерес. Однако применение естественных МВ ограничивает сложная процедура выделения и небольшой выход. Был предложен способ получения МВ в повышенном количестве с использованием вещества цитохалазина В. При этом количественная оценка стабильности индуцированных МВ в растворе изучена недостаточно. Поэтому целью нашей работы стала оценка стабильности иМВ МСК при различных условиях хранения в течение 112 дней.

Микровезикулы получали обработкой МСК 10 мкг/мл цитохалазина В, как описано ранее. Цитохалазин В является агентом дезорганизации клеточного цитоскелета и большого выхода МВ. Полученные МВ ресуспендировали в физиологическом растворе и хранили в различных условиях: при 37°C, 4°C, -20°C, 25°C, лиофилизировали и хранили при -20°C. Количество МВ анализировали с помощью проточной цитометрии с усиленным детектором светорассеяния (BD FACS Aria III BD Bioscience, США).

Впервые нами было обнаружено, что хранение при 37°C в течение 7 дней позволяет сохранить лишь 30% целых МВ от первоначального числа. Хранение при 25°C в течение 28 дней позволило сохранить только 47% исходного количества, тогда как хранение при 4°C позволило продлить срок годности МВ до 112 дней с сохранением 59% МВ. Лيوфилизация привела к получению 49% интактных МВ. В то время как при замораживании МВ, ресуспендированных в физиологическом растворе при -20°C, сохранялось 79,5% МВ.

Таким образом, хранение иМВ МСК в физиологическом растворе при -20°C является наиболее подходящим условием хранения МВ в течение не менее 112 дней. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-10035.

УРОКИНАЗНЫЙ РЕЦЕПТОР И ТКАНЕВОЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА КАК ГЕНЫ РАННЕГО ОТВЕТА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ

**П.С. Климович^{1,2}, В.С. Бойченко¹,
К.А. Рубина¹, О.И. Ивашкина³, К.А. Торопова³,
К.В. Анохин^{3,4}, Е.В. Семина¹**

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

² Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ Кардиологии им. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

³ Институт перспективных исследований мозга, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ НИИ Нормальной Физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

e-mail: lex2050@mail.ru

Ключевые слова: когнитивная нагрузка, память, урокиназная система, урокиназный рецептор, гены раннего ответа, система активаторов плазминогена.

Память представляет собой одну из основных функций головного мозга, необходимую для хранения и извлечения информации, и которая составляет основу всего постнатального когнитивного развития человека. На клеточном уровне формирование памяти обусловлено возникновением de novo синаптических связей за счет активации генов раннего ответа и реконфигурации ГАМКинтернейронов в гиппокампе и ассоциативной области коры [1].

Одной из основных систем, участвующих в когнитивном развитии организма, является система активаторов плазминогена, состоящая из протеазы урокиназы uPA (ген PLAU), ее рецептора uPAR (ген PLAU-R), ингибитора урокиназы PAI-1 (ген SERPINE1) и тканевого активатора плазминогена tPA (PLAT). В нервной ткани урокиназная система опосредует миграцию нейронов в эмбриогенезе и онтогенезе, рост и регенерацию аксонов нейронов, регуляцию генов, связанных с апоптозом. Полиморфизмы генов PLAU и PLAU-R ассоциированы с рядом неврологических патологий, нейродегенеративных и психических расстройств (н-р, с болезнью Альцгеймера), что предполагает их участие в процессах, связанных с когнитивными функциями в головном мозге [2].

В исследовании анализировали экспрессию генов белков активаторов плазминогена в головном мозге мыши в условиях когнитивной нагрузки. Мышей помещали в серое открытое поле на 10 минут, после чего измеряли мРНК uPAR, tPA, uPA и PAI-1 в передней, задней коре и гиппокампе через определенные сроки после воздействия (1,3,6, 24 и 72 часа). Было обнаружено достоверное повышение экспрессии мРНК uPAR, tPA уже через час после когнитивной нагрузки во всех структурах головного мозга, что позволяет отнести их к генам раннего ответа. Более того наблюдался второй пик экспрессии через 24 часа ($p < 0,05$). Ранняя индукция генов PLAU-R и PLAT (1 час) свидетельствует об их вовлеченности в процессы, связанные с приобретением памяти (новизной), а вот более поздняя (24 часа) может объясняться формированием памяти — отставленным процессом, когда происходит перестройка нейрональной сети, консолидация памяти и перестройка.

Впервые в ответ на когнитивную нагрузку идентифицированы два новых гена раннего ответа: ген рецептора урокиназы и ген тканевого активатора плазминогена, что позволяет предположить их участие в формировании памяти и регуляции нейрональной пластичности. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант No 075 15 2020 801).

Литература:

1. Schomaker J., Meeter M. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. — 2015. — № 55. — P. 268–279.
2. Riemenschneider M., Konta L., Hum Mol Genet. — 2006. — Vol. 15. — № 16. — P. 2446–2456.

РОЛЬ Т-КАДГЕРИНА В АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**П.С. Климович^{1,2}, С.Э. Мирзаева¹,
В.Ю. Сысоева¹, Е.В. Семина¹, К.А. Рубина¹**

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

² Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ Кардиологии им. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: lex2050@mail.ru

Ключевые слова: адипоцитарная дифференцировка, адипонектин, Т-кадгерин, мезенхимальные стромальные клетки, преадипоциты, дипептидилпептидаза-4, адипоциты.

Жировая ткань играет важнейшую эндокринную роль в организме помимо непосредственной функции запаса липидов. Важнейшим гормоном, продуцируемым зрелыми адипоцитами, является адипонектин, системно

регулирующий процессы метаболизма и обладающий противовоспалительным и антиатерогенным эффектами, а также способностью повышать чувствительность к инсулину. Рецептором высокомолекулярной формы адипонектина является Т-кадгерин, экспрессированный во многих органах и тканях, включая жировую ткань. Именно Т-кадгерин опосредует протективные эффекты адипонектина в сердце и сосудах, полиморфизмы в гене Т-кадгерина ассоциированы с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Механизм участия Т-кадгерина в продукции адипонектина жировой тканью, регуляции обновления и дифференцировки адипоцитов неизвестен [1].

В исследовании использовали человеческие МСК с различным уровнем экспрессии Т-кадгерина: контрольные МСК, МСК с гиперэкспрессией Т-кадгерина (МСК Т+) и клетки, трансдуцированные контрольным вирусом (МСК Квир). Клетки культивировали в среде для адипогенной дифференцировки или в стандартной среде в качестве контроля, после чего выделяли мРНК и анализировали экспрессию следующих генов-маркеров: мезенхимальных прогениторов (CD34, PDGFR α , THY1), перицитов (PDGFR β), интерстициальных предшественников (P116, DPP4), преадипоцитов (CD36, ICAM, PPAR γ), маркеры белка амфирегулина (Areg) — CLEC11A, CD142 и маркеры вновь образованных адипоцитов (ADIPOQ and CAR3). Анализ полученных данных показал, что гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к повышению экспрессии DPP4 в 44 раза и адипонектина (ADIPOQ) в 2,6 раза в клетках, культивируемых в стандартной среде, что может указывать на их повышенный потенциал к спонтанной адипогенной дифференцировке. Одновременно в МСК Т+ клетках, культивируемых в стандартной среде, повышалась экспрессия маркеров зрелых адипоцитов: CD36 (в 13 раз) и ICAM (в 20 раз) по сравнению с контрольными клетками. Культивирование же клеток в среде для адипогенной дифференцировки приводило к снижению экспрессии DPP4 в клетках всех типов, однако этот эффект был выражен в 2 раза сильнее в клетках МСК Т+ по сравнению с клетками МСК Квир. Напротив, уровень экспрессии PDGFR β (маркера МСК и гладкомышечных клеток) был повышен в МСК Т+. В соответствии с нашими данными, мы предполагаем, что Т-кадгерин опосредует петлю отрицательной обратной связи и действует как регулятор в недифференцированных стволовых клетках и прогениторных адипоцитах, поддерживая недифференцированное состояние. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00402.

Литература:

1. Rubina, K.A.; Semina, E.V.; Kalinina, N.I.; Sysoeva, V.Y.; Balatskiy, A.V.; Tkachuk, V.A. *European Journal of Cell Biology* 2021, 100, 151183.

РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ: ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ

И.И. Кобякова, М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, Д.Д. Линькова

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

e-mail: bronnikova_i@pimunn.net

Ключевые слова: раневые покрытия, ожоги, цитотоксичность, адгезия, клеточная терапия.

Раневые покрытия много лет используются для местного лечения ожоговых и других дефектов кожи, препятствуя инфицированию ран, сохраняя влажную среду, стимулируя ангиогенез, синтез коллагена, формирование грануляционной ткани и др. Новым направлением лечения ран стали клеточные технологии, требующие подбор покрытий при их применении.

Цель работы — исследование раневых покрытий для оценки возможности использования их в сочетании с клеточной терапией.

Исследовано 4 вида используемых в клинике коммерчески доступных покрытий: № 1 — полимерная пленка на основе гидрофильных сополимеров винилацетата, № 2 — двухслойное гидроколлоидное покрытие на основе биополимеров и полиуретановой пленки, № 3 — гидроколлоидная матрица на полиуретановой основе, № 4 — гидрогелевая повязка на основе гибрида полиуритана. Методы исследования: МТТ-тест, метод прямого контакта, световая и флуоресцентная микроскопия, рН-метрия, вискозиметрия. В качестве тестовой культуры использовали охарактеризованную культуру дермальных фибробластов человека.

Результаты МТТ-теста показали, что суточные экстракты образцов были не токсичны, а экстракты, выделенные на 7 сутки, токсичны. Покрытие № 2 на 7 сутки инкубации изменяло рН ростовой среды в кислую сторону. Показано, что покрытия № 2 и № 3 значительно увеличивают вязкость ростовой среды. При прямом контакте покрытия № 2 и № 4 ингибировали пролиферацию клеток, при сохранении жизнеспособности, а контакт с покрытием № 3 через 3 суток приводил к гибели клеток. При посеве клеток на покрытия оказалось, что на поверхность покрытия № 1 клетки не прикрепляются, на поверхности покрытия № 4 наблюдали адгезию только единичных клеток, а на поверхности покрытий № 2 и № 3 клетки хорошо распластывались.

Заключение. Исследованные покрытия не могут использоваться в качестве матриц-носителей для трансфера клеток. Для кратковременного использования при клеточной терапии ран различного генеза возможно применение покрытия № 1.

БИОИСКУССТВЕННАЯ НАДКОСТНИЦА НА ОСНОВЕ КЛЕТочНЫХ СФЕРОИДОВ, ПОЛУЧЕННАЯ МЕТОДОМ БИОПЕЧАТИ

А.В. Ковалев¹, М.М. Сморгков¹, Е.В. Кудан², В.А. Миронов¹

¹ ФГБУ НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова МЗ РФ, Москва, Россия

² НИТУ МИСиС, Москва, Россия

e-mail: kovalevAV@cito-priorov.ru

Ключевые слова: надкостница, кость, клеточный сфероид, тканевая инженерия, биопечать.

Надкостница проявляет костеобразующий потенциал при регенерации и трансплантации, однако ограниченная доступность этой важной костной оболочки актуализирует разработку персонифицированной биоискусственной надкостницы (БИН) для удовлетворения потребности в эффективном лечении костных дефектов. Клеточные сфероиды могут служить важной составляющей БИН, учитывая высокую плотность клеток внутри сфероидов и преимущества максимизации межклеточных взаимодействий.

Цель — разработать конструкцию БИН с остеогенным потенциалом на основе клеточных сфероидов

и коллагенового скаффолда в форме пластины и способ ее производства на основе биопечати.

Клеточные сфероиды получали путем агрегации клеток надкостницы в агарозных лунках. Мембрана сформирована методом электроспиннинга из коллагена-1. Биопечать осуществлена биопринтером BIO X (CELLINK). Сфероиды распечатаны в один слой на поверхности мембраны. Далее конструктор созрел внутри биореактора (6–7 суток). Жизнеспособность сфероидов исследовали с помощью LIVE/DEAD®. Свернутая в трубочку БИН внутри диффузной камеры помещалась под псевдосиновиальную мембрану, предварительно сформированную на животной модели вокруг метилметакрилатного спейсера. В динамике проводились гистологическое исследование, флуоресцентная микроскопия, иммуногистохимия, выявление щелочной фосфатазы, остеопонтина и внеклеточных преципитатов кальция, электронная и лазерная конфокальная сканирующие микроскопии, морфометрия (NIS-Elements).

Клеточные сфероиды из культивированных клеток надкостницы связываются с поверхностью коллагеновой мембраны. В динамике происходит адгезия, частичное расплывание клеточных сфероидов на мембране, вглубь по волокнам мембраны мигрирует часть клеток сфероидов, они продуцируют коллагеновые волокна, образующие объединяющий волоконный остов, связывающий сфероиды с подлежащей мембраной. Соседние сфероиды сливаются между собой (тканевое слияние). БИН внутри диффузной камеры, имплантируемой в животную модель, образует хрящ и минерализованную соединительную ткань.

Путем биопечати получена БИН, объединяющая клеточные сфероиды со скаффолдом в соответствии с комбинированной синергетической стратегией тканевой инженерии. Конструктор обладает остеогенным потенциалом и прогнозируемо может стимулировать остеогенез при разработке различных биомиметических технологий поднадкостничной регенерации утраченных фрагментов костей *in vivo*. Статья подготовлена в рамках НИР, выполняемой по государственному заданию в ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова».

ГЕТЕРОСФЕРОИД С ЯДРОМ ИЗ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ КОСТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ

А.В. Ковалев, В.К. Ильина,
М.М. Сморгачев, Е.В. Прохорова

ФГБУ НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова МЗ РФ, Москва,
Россия

e-mail: kovalevAV@cito-priorov.ru

Ключевые слова: клеточный сфероид, тканевая инженерия, остеогенез.

Производство тканеинженерных трансплантатов для эффективного восстановления целостности костей путем заполнения ими крупных костных дефектов остается одной из важнейших задач биомедицины. Совместное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) и клеток надкостницы (КН) на скаффолде усиливает остеогенез и васкуляризацию конструктора после трансплантации. Агрегация этих двух типов клеток в одном клеточном сфероиде может объединить терапевтические потенциалы клеток с известными преимуществами сфероидов перед клеточной терапией.

Цель: разработать гомолог клеточного продукта — гетеросфероид из КН и ММСК КМ с фрагментом деминерализованного костного матрикса (ДКМ) в центре — и оценить его регенеративный потенциал *in vitro*.

В агарозную лунку погружался фрагмент измельченного ДКМ «Перфоост» (ЦИТО), а затем вносились суспензии клеток культур КН и ММСК КМ. После агрегации клеток полученные сфероиды переносили в культуральные флаконы на поверхность электроспиннинговых коллагеновых мембран и продолжали культивирование в остеогенной среде. Проводилось морфологическое исследование кинетики сфероидов, в т.ч. флуоресцентная микроскопия, иммуногистохимия, электронная и лазерная конфокальная сканирующие микроскопии, морфометрия (NIS-Elements).

Перенесенные в лунку клетки устанавливают межклеточные контакты, продуцируют внеклеточный матрикс и образуют сфероид с фрагментом ДКМ в центре. Полученные сфероиды несут жизнеспособные клетки, способны прилипать к коллагеновой мембране и расплываться на ней. Сфероиды способны к тканевому слиянию, образованию из слипшихся сфероидов на неадгезивных поверхностях более сложных конструкторов. ДКМ, образующий центральную часть гетеросфероида, надежно удерживается в т.ч. собственным внеклеточным матриксом сфероида и, вероятно, оказывает остеоиндуктивное влияние. В культуре клетки сфероида частично мигрируют по волокнам мембраны, в остеогенной среде формируют минерализованный коллагеновый волоконный остов, объединяющий сфероиды и коллагеновую мембрану.

Таким образом, нами разработан клеточный гетеросфероид с ядром из ДКМ, который содержит собственный внеклеточный матрикс, обладает регенеративным потенциалом и способностью к формированию минерализованного соединительнотканного матрикса *in vitro*, ДКМ позволяет увеличить размер сфероида без вероятности образования гипоксического ядра в центре. Статья подготовлена в рамках НИР, выполняемой по государственному заданию в ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова».

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭЛАСТОМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИДИМЕТИЛСИЛОКСАНА ДЛЯ ИМПЛАНТАТОВ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

В.В. Ковалева¹, Н.М. Кузнецов¹,
Е.П. Банин¹, А.Е. Крупнин^{1,2},
С.В. Крашенинников¹, С.Н. Чвалун^{1,3}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

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

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

e-mail: victorykovaleva@gmail.com

Ключевые слова: стимул-чувствительные материалы, диэлектрические эластомеры, давление Максвелла, модель Йо, полисилоксаны.

Сердечная недостаточность — ослабление насосной функции сердца, приводит к ухудшению качества жизни пациента или его смерти. Во всем мире от сердечной недостаточности страдает 41 миллион человек [1], поэтому поиск способов лечения данного заболевания является актуальной задачей. В настоящее время

многообещающим является комплексный подход, частично компенсирующий нарушения сердечных сокращений и замещающий функции пораженной электропроводящей системы сердца, что становится возможным благодаря использованию «умных» материалов, в частности диэлектрических эластомеров, способных обратимо деформироваться (растягиваться или сокращаться) в электрическом поле [2]. Перспективным полимером для создания таких материалов является полидиметилсилоксан (ПДМС). Одним из способов усиления отклика материалов на основе ПДМС на внешний электрический стимул является повышение диэлектрической проницаемости материала, что может быть достигнуто созданием полимер-полимерных или дисперсно-наполненных композитов на его основе.

В исследовании получены композиционные эластомерные материалы на основе ПДМС, наполненные частицами различной природы и формы (порошок железа, монтмориллонит и наноцеллюлоза) с концентрацией 5 масс.%. Морфологию частиц наполнителя изучали методами электронной микроскопии. По результатам механических испытаний на одноосное растяжение были определены значения модуля Юнга и коэффициенты для трехпараметрического упругого потенциала Йо в диапазоне деформаций до 800%. В широком диапазоне частот измерены зависимости электрофизических характеристик полученных эластомеров. Отклик материалов на внешнее электрическое поле исследовали с помощью реометра с параллельными плоскостями. Под действием электрического поля напряженностью 0,84 и 2,5 кВ/мм наблюдалось уменьшение нормальной силы за счет деформации композитных эластомеров под действием давления Максвелла [3]. В работе показана эффективность наноразмерных наполнителей с высоким характеристическим отношением и поляризуемостью для получения материалов с увеличенным откликом на внешний стимул. Исследование выполнено при финансовой поддержке Госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Roche E.T., Horvath M.A., Wamala I. et al. Sci. Transl. Med. 2017. V. 9. P. eaaf3925.
2. Perine R., Kornbluh R., Pei Q. et al. Science. 2000. V. 287. P. 836–839.
3. Anderson I.A., Gisby T.A., McKay T.G. et al. J. Appl. Phys. 2012. V. 112. P. 041101.

ЭФФЕКТ ПАМЯТИ ФОРМЫ ГИБРИДНЫХ ЭЛЕКТРОСПИННИНГОВАННЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА, ФУНКЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВОССТАНОВЛЕННЫМ ОКСИДОМ ГРАФЕНА, ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

**П.А. Ковалева¹, И.О. Парий²,
Р.А. Сурменев², Ф.С. Сенатов¹**

¹ ФГБАОУ ВО НИТУ МИСИС, Москва, Россия

² ФГБАОУ ВО Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

e-mail: zhukova.pa@yandex.ru

Ключевые слова: полилактид, поликапролактон, восстановленный оксид графена, гибридные скаффолды, электро-спиннинг, структура, эффект памяти формы, механические свойства, тканевая инженерия.

В настоящее время биополимеры широко используются в медицине. Значительное количество исследований сосредоточено как на создании полимерных композиционных материалов со специфическими свойствами, так и на изготовлении пористых конструкций для использования в реконструктивной хирургии [1].

Полилактид (PLA) и поликапролактон (PCL) — синтетические алифатические полимеры с различными свойствами [2], являются перспективными материалами благодаря своей биосовместимости и биodeградации [3]. PLA также признан полимером с эффектом памяти формы (ЭПФ) [4]. Это программируемый эффект, который заключается в том, что материалу можно придать временную форму, которую он будет сохранять до внешнего воздействия, возвращающего первоначальную форму [5]. Это актуально для создания различных медицинских устройств и, что более интересно, самоустанавливающихся имплантатов в фокусе реконструктивной медицины [5]. Используемые в данной работе частицы восстановленного оксида графена (rGO) обладают выдающейся электро- и теплопроводностью; включение таких частиц в полимерную матрицу может способствовать образованию тепловых центров и влиять на характеристики эффекта памяти формы. Кроме того, агенты в полимере влияют на морфологическую структуру и кристалличность полимерной матрицы, являясь дополнительным центром кристаллизации полимера.

В данном исследовании была проведена характеристика гибридных скаффолдов PLA-PCL, полученных методом электроспиннинга. Исследовано влияние небольшого количества (0,7, 1,0 и 1,5 мас. %) rGO на морфологию, структуру, тепловое поведение и характеристики памяти формы разработанных материалов. XRD и ДСК исследования выявили превращение полукристаллической орторомбической структуры PLA в квазиморфную как для чистых скаффолдов PLA-PCL, так и для гибридных композитных скаффолдов PLA-PCL-rGO после нагревания и цикла ЭПФ. Добавление rGO способствовало изменению структуры полученных композитов, улучшению их механических характеристик и не оказывало существенного влияния на характеристики памяти формы. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 21-73-205).

Литература:

1. Amiryaghoubi N., Fathi M., Barar J. et al. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2022. P. 103360.
2. Sarde B., Patil Y.D. Materials Today: Proceedings. 2019. V. 18. P. 3780–3790.
3. Leonés A., Soneca A., Lopez D. et al. European Polymer Journal. 2019. — V. 117. — P. 217–226.
4. Xie X., Chen Y., Wang X. et al. Journal of Materials Science & Technology. 2020. V. 59. P. 243–261.
5. Mareedu T., Poiba V.R., Vangalapati M. Materials Today: Proceedings. 2021. V. 42. P. 1498–1501.

HLA-E-ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ЭКСПАНСИИ НК-КЛЕТОК

Е.И. Коваленко, Н.А. Алексеева, М.А. Стрельцова

ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, Россия

e-mail: lenkovalen@mail.ru

Ключевые слова: НК-клетки, натуральные киллеры, HLA-E, пролиферация, экспансия НК-клеток, цитомегаловирус, NKG2C.

Мульти-modalность иммунного действия НК-клеток обеспечивается как неспецифическими реакциями, включающими натуральную и антителозависимую цитотоксичность, а также продукцию цитокинов, так и специфической активацией, связанной с формированием адаптивных НК-клеток. Применение препаратов на основе НК-клеток рассматривается как перспективная стратегия в противоопухолевой и противовирусной терапии, одним из условий успешности которой является накопление функционально активных НК-клеток *in vitro*.

Ранее нами был продемонстрирован высокий уровень экспансии субпопуляций НК-клеток при их стимуляции с использованием клеток K562, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21 [1]. В данной работе нами получены генноинженерные клетки, способные экспрессировать, дополнительно к IL-21, неклассическую молекулу MHC класса I HLA-E, лиганд активирующего рецептора NKG2C, экспрессия которого характерна для адаптивных НК-клеток, ассоциированных с цитомегаловирусной инфекцией (CMV). Показано, что стимуляция НК-клеток CMV-серопозитивных доноров с применением полученных вспомогательных клеток в присутствии синтетического пептида CMV может индуцировать клеточную экспансию, в несколько раз превышающую экспансию, вызванную клетками с мембраносвязанным IL-21. При этом, ответ НК-клеток разных индивидов отличался значительной вариабельностью. С использованием культур, полученных из 100 клеток, была исследована пролиферативная активность субпопуляций НК-клеток, различающихся по стадии дифференцировки, лицензированной и наличию рецептора NKG2C. Наиболее высокий уровень пролиферации НК-клеток CMV-серопозитивного здорового добровольца был зарегистрирован в субпопуляции CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺, соответствующей фенотипу адаптивных НК-клеток [2]. Коэффициент экспансии этой субпопуляции в ответ на презентацию пептида CMV составил более 3×10^4 через 17 дней, что в 10 и более раз превышало коэффициент экспансии других субпопуляций. Интересно, что некоторые субпопуляции НК-клеток CMV-серонегативных доноров также пролиферировали более активно в ответ на стимуляцию HLA-E-экспрессирующими клетками, в том числе, за счет экспрессии NKG2C *de novo*. Применение экспрессирующих HLA-E клеток для наращивания специализированных субпопуляций НК-клеток может оказаться полезным для разработки способов противовирусной терапии пациентов с иммуносупрессией при онкологических заболеваниях. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00503.

Литература:

1. Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., et al. *PLoS One*. 2018. Vol. 13, e0208469.
2. Kovalenko E.I., Streltsova M.A., Kanevskiy L.M., et al. *Curr. Protoc. Cytom.* 2017. Vol. 79, 9.50.1–9.50.11.

КЛЕТочная линия увеальной меланомы для моделирования метастатических поражений центральной нервной системы

**О.А. Коваль^{1,2}, А.А. Нуштаева¹, М.М. Бирюков^{1,2},
О.А. Троицкая¹, Д.Д. Новак¹, Т.А. Гайнер^{1,3},
Е.В. Милахина⁴, Д.Э. Закревский⁴,
В.В. Атаманов⁵, Н.В. Кононова⁵, М.Е. Соболева⁵,
В.Р. Мун⁵, В.В. Черных⁵, И.В. Швейгер⁶**

¹ Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³ Группа компаний «Центр новых медицинских
технологий», Новосибирск, Россия

⁴ Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский филиал ФГАУ НИМЦ ГМНТК
Микрохирургия глаза Минздрава России,
Новосибирск, Россия

⁶ Институт теоретической и прикладной механики
им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск,
Россия

e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: увеальная меланома, клеточные модели, холодная плазменная струя, наночастицы.

Увеальная меланома — это опухоль нейроэктодермального происхождения, которая возникает в результате злокачественной трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока. Увеальная меланома в большинстве случаев приводит к необходимости удаления пораженного глаза, поэтому, изучение увеальной меланомы на клеточных моделях и моделях на животных, а также разработка современных низкотравматичных подходов к ее лечению являются актуальными задачами.

Целью исследования являлось получение и характеристика новой клеточной и опухолевой модели увеальной меланомы человека для тестирования инновационных противоопухолевых и антиметастатических подходов. Из опухолевого образца была получена культура меланоцитов uMEL1. Клетки uMEL1 имеют звездчатую или трехгранную форму и содержат гранулы меланина. На поверхности клеток присутствует мембранный гликопротеин Mel-CAM, характерный для меланомы кожи, и способствующий опухолевой прогрессии, обуславливая взаимодействия между трансформированными меланоцитами и эндотелиальными клетками. Определена туморогенность клеток uMEL1 при трансплантации мышам линии SCID, что делает возможным моделирование метастатических поражений ЦНС.

Согласно цитогенетическому анализу, 90% клеток uMEL1 имеют околодиплоидный кариотип (количество хромосом в клетке от 44 до 47), а 10% клеток околотетраплоидны (количество хромосом 90 или 92); во всех метафазных пластинках видны множественные хромосомные перестройки.

При исследовании чувствительности клеток uMEL1 к инновационному противоопухолевому воздействию — обработке струей холодной плазмы атмосферного давления показано, что добавление наночастиц золота, покрытых полиэтиленгликолем (AuNP-PEG) усиливает цитотоксическое действие облучения. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-49-08003.

МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

**О.С. Кожевникова¹, А.А. Шкляр^{1,2},
А.С. Дербенева^{1,3}, И.Ф. Никулич^{1,3},
А.Ж. Фурсова^{1,3}, Н.Г. Колосова¹**

¹ ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³ Новосибирская областная больница, Новосибирск,
Россия

e-mail: oidopova@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, анти-VEGF терапия, микроРНК.

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — прогрессирующее многофакторное заболевание глаз, является одной из основных причин потери центрального зрения у лиц старше 60 лет [1]. Более 10 лет стандартом лечения неоваскулярной формы ВМД (нВМД) является анти-VEGF терапия — интравитреальное введение антител против фактора роста эндотелия сосудов. Несмотря на лечение, у 15–30% пациентов наблюдаются ухудшение анатомических и зрительных функций из-за персистирующей неоваскулярной активности. Этот аспект требует более глубокого понимания альтернативных путей хориоидального неоангиогенеза. Вариабельность ответа на анти-VEGF терапию, включая задержку ответа, неполный ответ и его отсутствие, тахифилаксия и рецидивы определяют актуальность поиска биологических маркеров — прогностических критериев ответа на лечение. В настоящее время идет поиск новых диагностических и терапевтических мишеней ВМД среди малоизученных сигнальных каскадов этиопатогенеза ВМД.

Одним из перспективных подходов к диагностике, прогнозу течения заболевания и оценке эффективности лечения ВМД рассматривается профилирование экспрессии микроРНК в плазме крови (жидкая биопсия). Мы провели пилотное исследование, направленное на оценку профилей микроРНК 20 пациентов, разделенных на три группы: группа, состоящая из пациентов с ВМД, которые продемонстрировали хороший ответ на анти-VEGF; группа пациентов с плохим ответом; контрольная группа без патологии глазного дна. Для оценки экспрессии микроРНК в плазме крови использовали микрочиповые ПЦР-панели (Qiagen) с охватом 179 микроРНК. Анализ показал значительную вариабельность в экспрессии микроРНК, при этом наблюдалась кластеризация групп с ВМД и контрольной группы. С помощью биоинформатических подходов выделены гены-мишени дифференциально представленных микроРНК и регулируемые ими пути, потенциально участвующие в патогенезе ВМД. Хотя необходимы дополнительные исследования, miR-146b-5p, miR-122, miR-27a-3p и miR-21-5p представляют интерес для дальнейшего изучения в качестве маркеров ответа на лечение нВМД. Поддержано грантом РФ № 21-15-00047.

Литература:

1. Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Derbeneva A.S. et. al. Biomedicine. 2022. V. 10. P. 1658.

3D КУЛЬТИВИРОВАНИЕ УСИЛИВАЕТ АНГИОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ VEGF, СЕКРЕТИРУЕМОГО ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТВОЛОВЫМИ/СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

**И.В. Кожухарова, Л.Л. Алексеенко,
О.Г. Люблинская, А.П. Домнина**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kojuxarova@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, стромальные клетки, эндометрий, васкулярный эндотелиальный ростовой фактор, сфероиды, ангиогенез.

Секреция разнообразных ростовых факторов и цитокинов мезенхимальными стволовыми/стромальными клетками (МСК) играет определяющую роль в терапевтическом эффекте, проявляемом МСК при трансплантации. Ангиогенез в местах поврежденной является необходимым условием успешной регенерации ткани. МСК, выделенные из менструальной крови (еМСК) секретируют ангиогенные факторы, главным из которых является васкулярный эндотелиальный ростовой фактор VEGF. В работе исследовали динамику экспрессии и секреции VEGF в еМСК, ее корреляцию с ангиогенным потенциалом еМСК. Показали, что экспрессия и секреция VEGF усиливается при кратковременном культивировании еМСК в 3D сфероиде, и снижается при нокадауне гена VEGF с помощью коротких интерферирующих РНК. Ангиогенный эффект оценивали по влиянию кондиционированной среды еМСК на жизнеспособность и дифференцировку эндотелиальных клеток человека (HUVEC), а также при совместном культивировании еМСК и HUVEC. Показали, что еМСК из сфероидов обладают более сильным ангиогенным потенциалом по сравнению с монослойной культурой еМСК. Работа поддержана грантом РФ № 22-74-10126.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОИНТЕГРАЦИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

**А.А. Кокорина^{1,2}, Т.В. Мосогутов²,
Д.А. Решеткина², В.Н. Александров^{1,2}**

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия
им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: arina.alexandrovna.bio@gmail.com

Ключевые слова: децеллюляризация, тонкая кишка, коллагеновый матрикс.

Актуальным вопросом для тканевой инженерии является оценка возможности использования ксеногенной децеллюляризированной ткани, поскольку материал от животного может быть отобран с учетом большого количества необходимых характеристик, что не всегда возможно при заборе кадаверных органов. С другой стороны, реакции реципиента при имплантации материала ксеногенного происхождения изучены в меньшей степени. В связи с этим целью работы стала оценка биоинтеграции децеллюляризированной ткани ксеногенного происхождения при гетеротопической имплантации.

Ткань тонкой кишки кролика была децеллюляризована детергентным (группа 1, n=3) или детергентно-ферментативным методом с использованием дезоксирибонуклеазы (группа 2, n=3). Участки бесклеточного матрикса площадью 2 см² были имплантированы подкожно крысам в область холки, эксплантированы вместе с прилежащими тканями через 14 сут. После фиксации в 10% формалине проведена стандартная гистологическая проводка. Срезы толщиной 3–5 мкм окрашены гематоксилином-эозином и по Ван Гизону.

Спустя 14 сут децеллюляризованная ткань оставалась бесклеточной или практически бесклеточной в центральных областях. По периферии материала визуализировался слой коллагеновых волокон, включающий клеточные элементы фибробластоподобной морфологии, более выраженный в группе 2. Возможно, данная структура является формирующейся соединительнотканной капсулой. Также четко выделялся промежуточный слой, преимущественно инфильтрированный фибробластами, лимфоцитами, эозинофилами и макрофагами.

Ткань тонкой кишки после процедуры децеллюляризации является довольно плотной, что является причиной длительной миграции клеток вглубь матрикса. Процессы реорганизации ткани начинаются с периферии, и требуется более длительное наблюдение для оценки итога данного процесса. Работа была поддержана «Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) в рамках работы по конкурсу «УМНИК-2020» (дог. № 17022ГУ/2021 от 10.06.2021 г.).

СОЗДАНИЕ ПРЕПАРАТА С РЕГЕНЕРАТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА BIFIDOBACTERIUM ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПЕРФТОРДЕКАЛИНОМ

Е.П. Колеватых

ФГБОУ ВО Кировский государственный медицинский университет Минздрава России, Киров, Россия

e-mail: hibica@mail.ru

Ключевые слова: вторичные метаболиты, пробиотические штаммы, бифидобактерии, перфтордекалин, культивирование, регенерация.

Бактерии рода *Bifidobacterium* играют важную роль в современной промышленной микробиологии, биологической инженерии и биофармацевтике. Они являются продуцентами метаболитов с различными свойствами [1]. Целью работы являлась оценка возможности интенсификации темпов роста *Bifidobacterium bifidum* 791 при культивировании с использованием перфторорганических соединений, получение метаболитов и изучение регенеративных свойств [2,3]. Использовали перфтордекалин производства ОАО «Кирово-Чепецкий химкомбинат им. Б.П. Константинова» [4]. В качестве культивируемого биообъекта был производственный штамм *Bifidobacterium bifidum* 791. Режим культивирования отрабатывался на лабораторном ферментере BIOSTAT®plus фирмы Sartorius (Германия). Применяли полужидкую питательную среду Блаурокка, в которую в опытной группе добавляли 2% раствор перфтордекалина. Интенсивность роста культуры *Bifidobacterium*

bifidum 791 оценивали методом высева серийных разведений отобранных в разные промежутки времени проб культуральной жидкости на плотную питательную среду. Затем получали метаболиты, очищали от балластных веществ, стерилизовали. Применяли полученную массу веществ в качестве лекарственного вещества при нанесении на поверхность моделированного термического ожога лабораторных беспородных крыс [5]. В результате исследования установили, что вторичные метаболиты производственного штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, полученные при культивировании на питательных средах в присутствии перфтордекалина, вызывают активные регенеративные процессы по сравнению с веществами, выделенными из бактерий с питательной среды Блаурокка без специфических добавок.

Литература:

1. Бакулин В.М., Туманов А.С. и др. Антибиотики и химиотерапия, 2014. — № 59. — С.7–8.
2. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Антибиотики и химиотерапия, 2015. — №. — С.
3. Subramani R., Aalbersberg W.J. Microbiol.Ris, 2012. V. 167 P. 571.
4. Бакулин М.К., Дармов И.В. и др. Биомедицинский журнал Медлайн, 2004. — Т.5. — С. 235.
5. Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине / Под ред. Г.А. Сафронова Тез. науч. конф. 19–20 июня 2001 г. Санкт-Петербург: ВМА, 2001. — 129 с.

CD133⁺ И CD133⁻ КЛЕТКИ ГЛИБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОЗДЕЙСТВИЮ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ И НЕЙРОИНДУКТОРНЫМИ ФАКТОРАМИ

В.А. Колесникова¹, А.В. Ревизин¹, Д.Ю. Усачев², А.М. Копылов³, Г.В. Павлова^{1,2,3}

¹ ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия.

² НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия.

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

⁴ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия.

e-mail: v.kolesnikova@ihna.ru

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, опухолевые глиомные стволовые клетки, G-квадруплексы, малые молекулы, пролиферация.

Мультиформная глиобластома представляет собой одну из самых злокачественных опухолей головного мозга человека. Существующие методы терапии позволяют продлить жизнь пациента, но 5-ти летняя выживаемость пациентов с таким диагнозом составляет всего около 5% [1]. Вероятной причиной возникновения рецидивов опухоли могут являться резистентные к терапии опухолевые стволовые клетки глиомы. Одним из предположительных маркеров таких клеток принято считать поверхностный трансмембранный белок CD133 [2]. В предлагаемом подходе используется стратегия, в которой изначальное ингибирование пролиферации клеток с помощью антипролиферативного G-квадруплекса (GQ) сопровождается индуцированием клеток в сторону нейральной дифференцировки с помощью малых молекул SB431542 (SB), purmorphamine (PRM), LDN-193189 (LDN) и Brain-Derived Neurotrophic

Factor (BDNF), используемых для такой дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [4,5].

Цель работы. Получить CD133⁺ и CD133⁻ культуры клеток глиобластомы и оценить устойчивость полученных культур к воздействию антипролиферативного G-квадруплекса и его комбинации с малыми молекулами.

Методы. Оценка экспрессии таргетного гена проводилась методом RT-qPCR. Получение CD133-обогащенной и обедненной культур проводилось с помощью иммуномагнитной сепарации. Для оценки пролиферативной активности клеток после воздействия исследуемыми комбинациями факторов использовался МТТ тест. Исследование пролиферативной активности проводилось на 10^й и 20^й день эксперимента. В качестве антипролиферативного фактора использовались два G-квадруплекса biHD1 и bi-(AID-1-T), показавших значимое ингибирование пролиферации культур глиобластомы [3]. Добавление нейроиндукторных малых молекул проводилось по следующей схеме: на 1^й день эксперимента добавлялся GQ в концентрации 37,5 мкМ, на 3^й день добавлялись малые молекулы SB (10 μM) и LDN (1 μM). На 5^й день добавлялся pargmorphamine (2 μM). На 7^й день добавлялся последний фактор BDNF (20 ng/mL).

Результаты. Из панели культур IV Grade наибольшей экспрессией маркера CD133 обладала культура GO1, которая использовалась в дальнейшем для выделения CD133⁺ и CD133⁻ популяций клеток. МТТ тест для культуры GO1 CD133⁺ показал, что данная культура устойчива к воздействию исследованных комбинаций biHD1, biHD1+BDNF, biHD1+PRM, biHD1+SB, bi-(AID-1-T), bi-(AID-1-T)+BDNF, bi-(AID-1-T)+PRM, bi-(AID-1-T)+SB. Культура GO1 CD133⁻ оказалась более чувствительной к воздействию, полное ингибирование пролиферации наблюдалось при добавлении bi-(AID-1-T) и bi-(AID-1-T)+BDNF. На 20^й день эксперимента картина значительно изменилась. Все исследованные комбинации значимо ингибировали пролиферацию клеток культуры GO1 CD133⁺. В культуре GO1 CD133⁻ также значимо снижался пролиферативный потенциал при использовании всех исследуемых комбинаций за исключением bi-(AID-1-T), при воздействии которого произошло повышение пролиферации по сравнению с 10^м днем эксперимента.

Выводы. Полученные культуры клеток глиобластомы человека, обогащенные и обедненные по CD133, обладают различной чувствительностью к воздействию антипролиферативных и нейроиндукторных факторов. Тем не менее, удалось подобрать комбинации факторов, значимо снижающие пролиферативный потенциал исследуемых культур. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030).

Литература:

1. Batash R., Asna N., Schaffer P. et al. *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. I. 27. PP. 3002–3009.
2. Brescia P., Ortensi B., Fornasari L. et al. *Stem Cells.* 2013. V. 31. I. 5. PP. 857–869.
3. Legatova, V., Samoylenkova, N., Arutyunyan et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. I. 7. P. 3372.
4. Shutova, M. V., Chestkov, I. V., Bogomazova et al. *Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. Springer Protocols Handbooks.* Humana Press. 2011. PP. 133–149.
5. De D., Halder D., Shin I. et al. *Chem.Soc.Rev.* 2017. V. 46. I. 20. PP. 6241–6254.

СЕРТОНИНОВЫЙ 5-HT_{1A} РЕЦЕПТОР В АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНОМ ПОВЕДЕНИИ: РОЛЬ СЕРТОНИНОВОЙ И BDNF СИСТЕМ

Е.М. Кондаурова, А.С. Цыбко,
Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

e-mail: kond_em@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: серотониновая система; рецептор 5-HT_{1A}; AAV-опосредованная сверхэкспрессия; поведение, аутизм; мыши BTBR.

Расстройства аутистического спектра (РАС) являются одной из главных эпидемиологических проблем человечества. Механизмы, лежащие в основе РАС, до сих пор плохо изучены. Серотонин (5-HT) и нейротрофический фактор мозга (BDNF) известны своей ролью в пластичности мозга и поведения. Взаимодействие этих двух систем хорошо описано в литературе. Среди множества серотониновых рецепторов особое внимание привлекает 5-HT_{1A}-рецептор, поскольку является основным регулятором функциональной активности 5-HT-системы головного мозга, участвующей в регуляции различных типов нормального и патологического поведения. В данной работе мы исследовали влияние сверхэкспрессии 5-HT_{1A}-рецептора (вызванной введением аденоассоциированного вирусного конструкта AAV-Syn-HTR1A-EGFP) в гиппокампе мышей линии BTBR T Itpr3/J на аутистически-подобное поведение, экспрессию 5-HT₇ рецептора, BDNF и рецепторов BDNF. Линия мышей BTBR является одной из наиболее широко используемых животных моделей аутизма. Они демонстрируют основные поведенческие характеристики, определяющие РАС, включая нарушение социальных взаимодействий и повторяющееся стереотипное поведение [1]. Сверхэкспрессия 5-HT_{1A} рецептора в гиппокампе мышей линии BTBR привела к значительному снижению выраженности стереотипного поведения в тесте закапывания шариков и к увеличению времени пребывания в центре в тесте «открытое поле». В то же время сверхэкспрессия 5-HT_{1A} рецептора не повлияла на социальное поведение в трехкамерном тесте, время неподвижности в тесте «подвешивание за хвост», двигательную активность в тесте «открытое поле» и ассоциативное обучение в парадигме «оперантная стенка». Усиление экспрессии 5-HT_{1A} рецептора в гиппокампе сопровождалось значительным повышением уровня мРНК и белка 5-HT₇ рецептора в гиппокампе. Также сверхэкспрессия 5-HT_{1A} рецептора привела к значительному снижению уровня мРНК и белка TrkB рецептора, но не оказала влияние на экспрессию рецептора р75^{NTR} у мышей BTBR и самого нейротрофического фактора мозга.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить участие взаимодействия 5-HT и BDNF систем, опосредуемого через рецепторы 5-HT_{1A} и TrkB, в механизмах аутистически-подобного поведения у мышей BTBR. Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом #FWNR-2022-0023. Исследование было поддержано Российским научным фондом, грант № 22-15-00028.

Литература:

1. Stephenson D.T., O'Neill S.M., Narayan S., et al. *Molecular autism.* 2011, 2: 7.

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ ПРОДУКТ ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

А.А. Кондратенко, Д.В. Товпеко,
Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов

Военно-медицинская академия им.С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kondraa24@gmail.com

Ключевые слова: регенеративная медицина, раневое покрытие, Вартонов студень пуповины человека, децеллюляризация, неиммуногенность, цитотоксичность.

Создание продуктов для реконструкции поврежденных тканей является актуальной задачей биомедицинских исследований. В лаборатории тканевой инженерии Военно-медицинской академии изготовлен неиммуногенный биотехнологический продукт, состоящий из бесклеточного Вартонова студня пуповины человека, обладающего регенеративными свойствами.

Цель исследования — оценить влияние биотехнологического продукта из пуповины на метаболическую активность фибробластов дермы человека *in vitro* и заживление ран *in vivo*.

Метод детергентной децеллюляризации Вартонова студня в нашей модификации позволил получить тканеинженерный продукт, сохраняющий регенеративные свойства исходного биоматериала [1]. Цитотоксичность продукта тканеинженерного продукта исследовали с помощью колориметрического теста метаболической активности дермальных фибробластов человека. Влияние препарата на заживление полнослойных кожных ран изучали на белых мышах. Животным контрольной группы тканеинженерный продукт в рану не вводили.

Биотехнологический продукт не проявляет цитотоксических свойств. Формирование грануляционной ткани на дне дефекта протекает более динамично при наличии в ране бесклеточного продукта. Он послужил адгезивной подложкой для клеток с фибробластоподобной морфологией. При этом массивной лейкоцитарной инфильтрации и отека в перифокальных областях не выявлено.

Нецитотоксический бесклеточный матрикс пуповины человека может быть идеальным субстратом для адгезии и колонизации пациент-специфическими клетками при использовании в качестве раневого покрытия при глубоких повреждениях кожи и мягких тканей [2].

Литература:

1. Калюжная-Земляная Л.И., Чернов В.Е., Пат. РФ № 2745995. Приоритет изобретения 16 сентября 2020 г.
2. Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е. и соавт. Гены & Клетки — 2021. — Т. XVI — № 3. — С.72–79.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ G2019S В КИНАЗЕ LRRK2 НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ И МИТОФАГИЮ В ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

И.В. Копылова¹, К.С. Майорова¹,
В.А. Вигонт², Д.А. Грехнев², А.Н. Богомазова¹,
О.С. Лебедева¹, М.А. Лагарькова^{1,3}

¹ ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА,
Москва, Россия

² ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
Россия

³ ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва,
Россия

e-mail: ikopylova.msu@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, дофаминэргические нейроны, митохондрии, окислительный стресс, клеточные модели, митофагия, ИПСК, технология CRISPR/Cas9.

Болезнь Паркинсона (БП), приводящая к дегенерации дофаминэргических нейронов (ДН), значительно снижает уровень жизни пациентов и при прогрессировании приводит к их смерти. В качестве одной из составляющих патогенеза БП рассматривают митохондриальную дисфункцию в ДН. Для исследования патогенеза БП на клеточном и субклеточном уровнях в настоящее время используют модели на основе ДН, которые получают путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с наследственными формами БП. В качестве контроля при этом используют изогенные линии ИПСК, в которых патогенная мутация исправлена. Это позволяет избежать влияния на результаты исследования индивидуального генетического фона пациента.

Аутосомно-доминантная мутация G2019S в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, является наиболее частой причиной наследственных форм БП. В норме LRRK2 участвует в поддержании цитоскелета, обмене митохондрий, ауто- и митофагии [1; 2; 3]. В нашей лаборатории из ИПСК пациента с мутацией G2019S при помощи технологии CRISPR/Cas9 были получены изогенные линии ИПСК с различными аллельными состояниями гена *PARK8*. Для моделирования БП изогенные линии ИПСК и линии ИПСК от здоровых доноров дифференцировали в функционально активные постмитотические ДН с чистотой популяции 90–99%. Изменения морфологии нейритов, количества и локализации аутофагосом и митохондрий в ДН в зависимости от аллельного состояния *PARK8* согласуются с данными литературы [4], что свидетельствует о возможности применения этой системы для моделирования БП. В данной работе с использованием созданной модели БП мы изучали функциональное состояние митохондрий и митофагию в ДН.

Нами показано, что мембранный разобщитель СССР достоверно усиливает митофагию в ДН пациента, если в нейронах присутствует хотя бы одна нормальная копия гена *PARK8*, но не в ДН, полученных из ИПСК здоровых доноров, что говорит о большей чувствительности ДН пациента к стрессовым воздействиям. Индуктор аутофагии трегалозу рассматривают в качестве возможного средства вспомогательной терапии при нейродегенеративных заболеваниях [5]. Нами продемонстрирована способность трегалозы активировать митофагию в ДН и повышать митохондриальный мембранный потенциал во всех линиях нейронов, кроме линии, гомозиготной по мутации G2019S. Требуется

дальнейшие исследования для изучения влияния трега-лозы на функциональную активность ДН. Мы благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ ФМБА за предоставление ресурсов для этого проекта.

Литература:

1. Plowey E.D. et al. *J. of Neurochemistry*. 2008. V. 105. № 3. P. 1048.
2. Wang X. et al. *Human Molecular Genetics*. 2012. V. 21. № 9. P. 1931.
3. Singh F. et al. *Elife*. 2021. V. 10. P. e67604.
4. Yue M. et al. *Neurobiology of Disease*. 2015. V. 78. P. 172.
5. Wang Y. et al. *Neurotoxicity Research*. 2018. V. 34. № 1. P. 109.

РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО РОСТА И ЕГО ЛИГАНДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Е.С. Корнилова^{1,2}, М.В. Харченко¹, Р.С. Каменцева¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: elena.kornilova@gmail.com

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, рецептор эпидермального фактора роста, лиганды, эндцитоз, пролиферация, дифференцировка.

В последние годы существенный прогресс был достигнут в выявлении специфических механизмов регуляции жизнедеятельности мезенхимных стволовых клеток, однако участие в функционировании МСК сигнальных систем, традиционно считающихся типичными для нестволовых клеток организма, практически не изучены. К таким системам относится тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его лиганды. Интересно, что трансформированный статус линий, полученных из карцином, связывают с сверхэкспрессией EGFR, тогда как по нашим данным уровень EGFR в стромальных клетках эндометрия человека (энМСК), также как и в МСК другого тканевого происхождения, сравним с таковым в клетках линий HeLa и A549, при сохранении «нормальности» энМСК. Очевидно, сравнительный анализ функционирования EGFR-зависимой системы в МСК и опухолевых клетках представляется весьма актуальным.

Сигнальная функция EGFR определяется активацией тирозинкиназы рецептора при формировании комплексов с его лигандами. К настоящему времени известно 7 лигандов, различающихся по аффинности к рецептору и сигнальным ответам, что позволяет осуществлять тонкую настройку системы в зависимости от контекста. Считается, что связывание лиганда с рецептором на плазматической мембране приводит к активации сигнальных каскадов и интернализации лиганд-рецептора в эндосомы. Мы обнаружили существенные отличия в организации эндцитозного аппарата, динамики эндцитоза и продукции перекиси водорода в энМСК по сравнению с HeLa под действием высокоаффинных лигандов EGF и TGF- α . Существенно, что в энМСК, в отличие от HeLa, уровень рецептора после его деградации в лизосомах не восстанавливается после удаления лигандов из среды. Показано, что EGF и TGF- α стимулируют пролиферацию энМСК, но не HeLa, в то время как низкоаффинный лиганд AREG

не интернализуется в клетках обоих типов, оказывая митогенный эффект только на HeLa. Анализ влияния лигандов EGFR на децидуальную дифференцировку энМСК показал, что EGF и TGF- α , но не AREG, подавляют этот процесс EGFR-зависимым образом. Мы предполагаем, что сигнальная система рецептора EGF и его лигандов может быть вовлечена в координацию фаз цикла, в частности, за счет контроля уровня и рецептора, и его лигандов как с помощью эндцитоза, так и синтеза этих белков. Обсуждаются возможные механизмы «диалога» лигандов к рецептору и причины различий в ответах энМСК и трансформированных клеток. Работа частично финансировалась за счет средств гранта РФФИ № 20-04-00927.

МАЛАЯ СУБПОПУЛЯЦИЯ КЛЕТОК, НЕСУЩИХ НА ПОВЕРХНОСТИ ИНСУЛИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР, РЕГУЛИРУЮТ АДИПОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ

Е.Р. Корчагина, Н.С. Волошин, К.Ю. Кулебякин

Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: korchagina.liza@mail.ru

Ключевые слова: МСК, адипогенез, инсулиновый рецептор, инсулинорезистентность.

В последнее время появляется все больше данных об особых функциональных популяциях жировой ткани, которые обнаруживаются как среди предшественников адипоцитов — в мезенхимных стволовых клетках (МСК) [1], так и среди зрелых клеток жировой ткани, в которой существует минимум 3 различных функциональных популяции клеток [2]. В ходе наших работ было показано наличие в первичной культуре МСК жировой ткани малой субпопуляции клеток, несущих на поверхности инсулиновый рецептор, и их возможное регуляторное влияние на адипогенную дифференцировку культуры. Для изучения данного явления была выбрана модель нарушения функции — первичная культура МСК жировой ткани доноров с подтвержденной инсулинорезистентностью.

Первичные культуры подвергали иммунохимическому окрашиванию антителами к внеклеточному домену инсулинового рецептора и выделяли малую субпопуляцию методом проточной цитометрии. Далее проводили адипогенную дифференцировку в присутствии инсулина в условиях неконтактного сокультивирования малой субпопуляции с обеднёнными данными клетками. Оценка дифференцировки проводилась при помощи определения транскриптов *PPAR γ* и *AdipoQ* (RealTime PCR) и флуоресцентной микроскопии с окрашиванием NileRed и DAPI.

При выделении малой субпопуляции обнаружилось, что содержание данных клеток у здоровых и инсулинорезистентных доноров различается (5–12% и 0–3,5% соответственно). Малая субпопуляция не отвечает на адипогенную дифференцировку, в то время как обеднённая популяция дифференцируется менее интенсивно, чем интактная. При неконтактном сокультивировании обнаруживается усиление дифференцировки обеднённой субпопуляции, полученной из здоровой ткани. Усиление дифференцировки происходит как в случае сокультивирования с малой субпопуляцией того же происхождения, так и с выделенной из инсулинорезистентной ткани. Одновременно с этим, инсулинорезистентная обеднённая субпопуляция не показывает усиления дифференцировки

при сокультивировании с малой субпопуляцией любого происхождения.

Результаты работы подтверждают гипотезу, что чувствительная к инсулину субпопуляция МСК регулирует дифференцировку в адипогенном направлении всей популяции. Однако, можно предположить, что механизм инсулинорезистентности в данном случае связан не с дисфункцией малой субпопуляции, а с нечувствительностью других МСК ткани к паракринным факторам, которые продуцирует данная субпопуляция.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (грант № 20-015-00508, Клеточные механизмы регуляции гормональной чувствительности и дифференцировки стволовых клеток, роль регуляторных субпопуляций).

Литература:

1. Schwalie PC, Dong H, Zachara M. et al. Nature. 2018 Jul;559(7712):103–108.
2. Bäckdahl J, Franzén L, Massier L et al. Cell Metab. 2021 Sep 7;33(9):1869–1882.e6.

МОДИФИЦИРОВАННАЯ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОСТНЫХ ПАСТ-ФИЛЛЕРОВ

**Е.С. Костандян¹, А.Р. Сатаева¹, С.А. Цырульников²,
Т.С. Серегина¹, В.А. Дятлов¹**

¹ ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия.

² НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия.

e-mail: evkosti12@gmail.com

Ключевые слова: костные пасты-филлеры, полисахариды, карбоксиметилцеллюлоза, гель-проникающая хроматография.

При создании гелеобразных материалов для регенеративной медицины большой интерес представляет полисахарид карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). Он удобен при создании шприцевых композитных паст-филлеров для малоинвазивного заполнения костных дефектов. К этим материалам предъявляют особые требования: они должны содержать разнообразные физиологически активные соединения, каждый компонент должен обладать собственной независимой кинетикой выделения. Недостатком, затрудняющим применение КМЦ, в качестве носителя физиологически активных компонентов, является отсутствие в структуре макромолекулы сайтов, удобных для химического связывания лекарственных веществ. Эффективным способом их создания является периодатное окисление по реакции Малапрада [1].

В работе методом ГПХ изучено влияния pH среды на молярное содержание окисленных звеньев и молекулярно-массовые характеристики продуктов исчерпывающего окисления КМЦ периодной кислотой. В результате было установлено, что фракции однородны и имеют близкий состав по удельному содержанию хроматорных карбоксильных групп в цепи. Все пробы содержат две полярные низкомолекулярные примеси. Трехмодальная гель-хроматограмма ДАКМЦ результат появления в полимере фракций с разным удельным содержанием карбоксильных групп в условиях неполного подавления комплексообразования. Так как в реакциях окисления могут принимать участие только звенья, не содержащие заместители в положениях 2 и 3, то предельное содержание диальдегидных фрагментов в цепи может составлять не более 60 звеньев на каждые 100 ангидроглюкозных единиц.

Экспериментально определенное значение их содержания во фракции с молекулярной массой 8 кДа составляет 72 звена. Это связано с тем, что в результате окисления и последующего гидролиза происходит обогащение низкомолекулярных фракций полимера фрагментами, не содержащими карбоксиметильных групп и способными к взаимодействию с окислителем. Неоднородность химической структуры исходной КМЦ играет определяющую роль в результатах исчерпывающего окисления полимера с последующим гидролизом. Независимо от pH среды образуются практически идентичный набор продуктов.

Литература:

1. Dyatlov V.A. et al. International Polymer Science and Technology. 2015. V. 42. № 4. P. 19–26.

СИСТЕМОЕ ВВЕДЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, СПОСОБСТВУЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЮ ДВИГАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ И СТИМУЛИРУЕТ МИЕЛИНИЗАЦИЮ

**А.А. Костенников¹, И.М. Кабдеш¹, Д.Х. Сабиров¹,
А.В. Тимофеева¹, Я.О. Мухамедшина^{1,2}**

¹ Казанский Федеральный (Приволжский) Университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

e-mail: maldito.goldpride@gmail.com

Ключевые слова: травма спинного мозга, мезенхимные стволовые клетки, внеклеточные везикулы, нейрорегенерация.

Внеклеточные везикулы (ВВ) являются медиаторами межклеточной коммуникации. Они играют важную роль во многих физиологических и патологических процессах. Цель исследования — оценить терапевтический потенциал ВВ, выделенных из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (МСК-ВВ), с целью регенерации травмированного спинного мозга крыс (ТСМ).

У самок крыс линии Wistar моделировали дозированную контузионную ТСМ. Первой контрольной группой являлись крысы с ТСМ, второй контрольной группой были крысы с ТСМ и аппликацией на область травмы фибринового матрикса (ФМ; ТСМ ФМ). Первой и второй опытным группам апплицировали 5 и 10 мкг МСК-ВВ, инкапсулированных в ФМ, соответственно (ТСМ ФМ+ВВ5, ТСМ ФМ+ВВ10). Третьей и четвертой опытной группе через 30 мин после ТСМ вводили внутривенно (в/в) 10 мкг и 50 мкг МСК-ВВ в 500 мкл 0,9% NaCl соответственно (ТСМ ВВ10, ТСМ ВВ50). Двигательную активность оценивали до ТСМ, после ТСМ на 7 сутки и далее каждые 3 дня с помощью поведенческой шкалы ВВВ. В результате эксперимента оценивали площадь сохранной ткани и патологических полостей. Был проведен количественный анализ клеток предшественников олигодендроцитов (Olig2+/NG2+) и зрелых олигодендроцитов (Olig2+/NG2-) в белом (VF и LF) и сером (VH) веществе спинного мозга. ПЦР-РВ был проведен на образцах спинного мозга на расстоянии 5 мм в каудальном направлении.

Было определено, что с 32 по 60 сутки эксперимента в группах ТСМ ВВ10 и ТСМ ВВ50 наблюдались стабильно более высокие (P < 0,05) показатели двигательной активности при сравнении с группой ТСМ. Также в период

с 30 по 50 сутки периодически регистрировались достоверные различия по данному показателю в группах ТСМ ФМ+ВВ5 и ТСМ ФМ+ВВ10 при сравнении с первой контрольной группой. В результате морфометрического анализа продемонстрировано, что процент сохранной ткани в группах ТСМ ФМ+ВВ10 и ТСМ ВВ10 был значительно выше ($P < 0,05$) при сравнении с аналогичным показателем в группах контрольных крыс — ТСМ и ТСМ ФМ. Оба варианта трансплантации ВВ способствовали поддержанию популяции $Olig2^+/NG2^+$ и $Olig2^+/NG2^-$ клеток и в опытных группах были обнаружены достоверные различия при сравнении с ТСМ ФМ в зонах VF и LF. В результате ПЦР-РВ было определено, что в \ в МСК-ВВ значительно увеличивали экспрессию мРНК гена *Mbp*. Высокая дозировка ВВ при в \ в приводит к увеличению экспрессии мРНК генов *Gap43*, *S100a10*. Минимальная дозировка ВВ при в \ в приводит к увеличению экспрессии мРНК генов *Psd95* и *NeuN*.

Результаты данного исследования продемонстрировали, что в \ в МСК-ВВ приводит к более эффективно-му восстановлению двигательной функции после ТСМ у крыс по сравнению с контролем. В \ в МСК-ВВ приводит к повышенному росту $Olig2^+$ клеток в сером и белом веществе спинного мозга, что косвенно свидетельствует о стимуляции миелинизации в нем.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ RUNX2 НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Костина¹, А.А. Лобов¹,
Е.С. Громова^{1,2}, В.В. Карелкин³,
Д.В. Смирнова^{1,4}, А.Б. Малашичева¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kostinadariaspb@gmail.com

Ключевые слова: Runx2, остеобласты, остеогенная дифференцировка.

Runx2 является ключевым регулятором и маркером остеогенной дифференцировки. Он влияет на экспрессию других проостеогенных генов и является звеном многих сигнальных каскадов, таких как Wnt, Notch, Sox9, Msx2, и сигнальный путь Hedgehog [1]. Регуляторная активность Runx2 по-разному изменяется в отношении разных генов-мишеней в зависимости от стадии дифференцировки, а на стадии минерализации его уровень снижается [2]. Runx2 является важнейшим регулятором дифференцировки остеобластов [3]. Остеобласты — это клетки взрослой кости, которые синтезируют большое количество различных белков, в том числе Runx2, и обладают способностью к внеклеточной минерализации. Однако роль Runx2 на поздних стадиях остеогенной дифференцировки остается слабо изученной.

Чтобы выяснить, какую роль играет Runx2 в дифференцировке остеобластов, были созданы лентивирусные конструкции, несущие 3 различные изоформы гена *RUNX2*: ген, кодирующий полноразмерный белок дикого типа, кодирующий укороченный вариант белка дикого типа и мутантный вариант гена *RUNX2*, содержащий стоп-кодон,

а также лентивирусная конструкция, несущая шпилечную РНК к *RUNX2*, приводящую к подавлению синтеза белка Runx2 при внесении в клетки. Методом лентивирусной трансдукции мы активировали либо подавляли продукцию Runx2 в первичных клетках остеобластов человека.

Биологический эффект лентивирусных конструкций был подтвержден несколькими методами: методом ПЦР в реальном времени было показано, что внесение лентивирусных конструкций приводило к повышению транскрипции *RUNX2* для всех трех изоформ в различных типах клеток. Методом иммуноблоттинга было показано, что при использовании созданных лентивирусных конструкций в клетках синтезируется повышенное количество соответствующих изоформ белка Runx2. С помощью исследования активности промотора *RUNX2* методом измерения активности люциферазы было показано, что промотор *RUNX2* активируется в ответ на внесение конструкций. При внесении шпильки на *RUNX2* активность его промотора снижалась.

Влияние повышенной экспрессии *RUNX2* на фенотип остеобластов было исследовано методами ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимии. Согласно полученным результатам, *RUNX2* стимулирует экспрессию остеокальцина, классической мишени *RUNX2* и подавляет экспрессию остеомаркера *BMP2* в остеобластах, а внесение шпильки на *RUNX2* нивелирует этот эффект.

Таким образом, было показано, что активация Runx2 в остеобластах влияет на их синтетические способности. Исследование проведено при поддержке гранта РФ 18-14-00152

Литература:

1. Rutkovskiy A., Stensløkken K.-O., Vaage I.J. Med. Sci. Monitor Basic Res., 2016, Vol. 22, P. 95–106.
2. Wu H., Whitfield T.W., Gordon J.A.R., et al. Gen. Biol., 2014, Vol. 15, No. 3, P. 52.
3. Franceschi R.T., Ge C., Xiao G., et al. Ann. of the New York Academy of Sci., 2007, Vol. 1116, No. 1, P. 196–207.

РЕЗИДЕНТНЫЕ Т-КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА В ЗАЖИВЛЕНИИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ РАН

Е.Г. Костоломова^{1,2}, Ю.Г. Суховой²,
И.Г. Унгер², Т.В. Акунеева²

¹ ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Тюмень, Россия

² ООО «Тюменский филиал института клинической и фундаментальной иммунологии», Тюмень, Россия

e-mail: lenakost@mail.ru

Ключевые слова: проточная цитометрия, кожа, резидентные Т-клетки, заживление ран, острая рана, хроническая рана.

Лечение длительно незаживающих ран это одна из сложнейших проблем. Youman O. et al. предположили, что резидентные Т-клетки кожи играют главную роль в кожном иммунном гомеостазе и патологии [1].

Цель работы: изучить роль эпидермальных $\alpha\beta^+$ и $\gamma\delta^+$ Т-клеток человека в заживлении острых и хроническими ран.

Материалы и методы. Образцы ткани и крови пациентов были доставлены из ГБУЗ ТО «ОКБ № 1», с острой травмой (n=10), с хронической (n=9). Суспензию клеток кожи получали по методике [2]. Исследование

фенотипического состава Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител CD3, CD28, $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В качестве негативного контроля использовались IgG. Анализ образца составил 50000–75000 клеток.

Результаты. Исследована популяция $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клеток в здоровом человеческом эпидермисе и дерме [3]. Обнаружено $2,7\% \pm 0,76$ и $0,26 \pm 0,09$ соответственно $\gamma\delta$ Т-клеток в коже по сравнению с кровью. Субпопуляция $\alpha\beta$ Т-клеток составила ($10,29\% \pm 3,4$ и $65,7\% \pm 11,3$ соответственно). Эпидермальные CD3+CD28+ $\alpha\beta$ ($79,2\% \pm 7,9$ и $5,4\% \pm 1,77$) и CD3+CD28+ $\gamma\delta$ ($71,3\% \pm 10,5$ и $4,6\% \pm 1,21$) клетки экспрессируют высокие уровни CLA по сравнению с клетками крови. Процесс заживления нарушается при хронических ранах, в связи со сниженным количеством резидентных Т-клеток в коже или функционально дефектных. Не было обнаружено существенных различий в соотношении $\alpha\beta$ к $\gamma\delta$ Т-клеткам при хронических ранах по сравнению с острыми. Однако, анализ абсолютных значений обнаружил, что 2890 ± 254 $\alpha\beta$ и 283 ± 31 $\gamma\delta$ Т-клеток/см² в нормальном эпидермисе и $10\ 860 \pm 512$ $\alpha\beta$ и 300 ± 57 $\gamma\delta$ Т-клеток/см² при острых и хронических ранах соответственно. В месте ран обнаружены в основном $\alpha\beta$ Т-клетки ($p < 0,001$), тогда как Т-клетки $\gamma\delta$, являются популяцией кожи.

Таким образом обнаруженная дисфункция Т-клеток может быть вызвана повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов, таких как апоптоз, которая усиливается в ответ на тяжелые повреждения. Идентификация эквивалента Т-клеток кожи человека позволит получить представление о механизме эффективного восстановления острых ран и выявить новые мишени для терапевтического вмешательства при лечении хронических ран. С клинической точки зрения, повреждение Т-клеток на ранней стадии процесса заживления раны может быть прогностическим фактором для формирования хронической раны.

Литература:

1. Voymann O, Conrad C, Tonel G, et al. Trends Immunol. 2007. V. 28. P. 51–57.
2. Гольцов С.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г. и др. Пат. РФ № 2630607 С1, МПК G01N 33/53. 2017.
3. Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В. РИЖ, 2017. Т. 11(20). № 3. С. 521–523.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМНОГО ВЛИЯНИЯ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, НАХОДЯЩИХСЯ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Н.В. Костюк, М.Б. Белякова, М.В. Черноуцкий, М.Б. Петрова

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ, Тверь, Россия

e-mail: p001637@mail.ru

Ключевые слова: жировая ткань, мезенхимные стромальные клетки, зрелые адипоциты, адипогенная дифференцировка, сокультивирование.

Нарушение нормального функционирования клеток жировой ткани лежит в основе патогенеза различных заболеваний, в том числе ожирения, диабета и т.д. Учитывая широкий спектр биологически активных молекул, продуцируемых этой тканью, можно предполагать

ключевую роль сдвига паракринных взаимодействий в развитии патологии. Цель настоящей работы — оценить *in vitro* взаимное влияние клеток жировой ткани, находящихся на разных этапах адипогенной дифференцировки.

В работе использовали клетки жировой ткани разной локализации, полученные от человека, крысы, кролика. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) и зрелые адипоциты выделяли в соответствии со стандартными протоколами. Адипогенную дифференцировку МСК индуцировали добавлением смеси инсулина, дексаметазона и изобутилметилксантана с последующей заменой на питательную среду, содержащую инсулин. От монокультуры к совместным культурам переходили через 0, 2, 5, 7 дней от начала индукции, моделируя разные стадии адипогенеза. Сокультивирование вели с использованием двухуровневой системы, где легко адгезирующие клетки локализованы на дне сосуда, а зрелые адипоциты — на «потолке» [1]. В ходе эксперимента оценивали долю жизнеспособных и липид-содержащих клеток, фиксировали время появления первых липидных капель, характер их распределения в цитоплазме, относительное количество липидов в культуре. Общее время наблюдения — 14 дней. Контролем служили индуцированные и неиндуцированные монокультуры МСК.

В целом адипоциты в совместной культуре оказывают стимулирующее действие на дифференцировку МСК, сокращая время появления первых липидных капель, увеличивая долю запасавших клеток и количество триглицеридов в них. Эффект присутствия зрелых клеток тем значительнее, чем на более ранней стадии находятся дифференцирующиеся клетки. Обратного влияния МСК и преадипоцитов на зрелые адипоциты отмечено не было. Полученные результаты подтверждают важную роль паракринной регуляции внутри жировой ткани.

Литература:

1. Kostiuk N.V., Belyakova M.B., Egorova E.N. et al. Scien. heritage. 2017. N. 13. P. 3.

СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ ЛИПОАСПИРАТА В РЕЖИМЕ МОНОТЕРАПИИ И СОЧЕТАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ С ПРЕПАРАТОМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕЧЕНИИ ГОНАРТРОЗА

М.А. Котова, Е.Я. Шевела, Т.Р. Глебова, Н.А. Ница, Г.А. Ахметова, Ю.А. Кожевников, И.В. Меледина, Е.Р. Черных

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

e-mail: kot.maria199411@mail.ru

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция, липоаспират, гиалуроновая кислота, остеоартрит, ВАШ, KOOS.

Остеоартрит (ОА) — наиболее частая форма артрита, характеризующаяся болями и тугоподвижностью суставов, приводящими к ухудшению качества жизни. Современные варианты лечения ОА нацелены на купирование болевого синдрома и повышение вязкости суставов с помощью внутрисуставного введения препаратов гиалуроновой кислоты (ГлК) [1]. Однако длительное применение некоторых из этих препаратов может вызывать серьезные побочные эффекты. Одно из новых направлений в лечении ОА связано с использованием клеточных технологий, в том числе стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани. Клетки СВФ оказывают

противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты, а также способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани.

Цель данного исследования: оценка безопасности и эффективности аутологичной СВФ у пациентов с гонартрозом, в том числе в комбинации с препаратом гиалуроновой кислоты.

Материалы и методы. В исследование были рекрутированы 32 пациента с ОА коленных суставов (гонартроз) (Rg стадия 2–3 по Kellgren-Lawrence) (NCT 02967874, clinicaltrials.gov). СВФ выделяли из жировой ткани пациентов. Пациентам выполняли внутрисуставную инъекцию: препарата гиалуроновой кислоты Ферматрон Плюс 1,5% 2,0 мл (ГлК) (группа 1, 10 пациентов), аутологичных клеток СВФ (группа 2, 16 пациентов), СВФ + ГлК (группа 3, 6 пациентов). Оценивали выраженность болевого синдрома по ВАШ и функциональный статус пораженных суставов по шкале KOOS.

Результаты. Пациенты исследуемых групп были сопоставимы по давности и тяжести основного заболевания, характеру сопутствующей патологии, выраженности болевого синдрома, а также нарушению функций коленных суставов. Внутрисуставное введение клеток СВФ было хорошо переносимым и не вызывало развития каких-либо серьезных нежелательных явлений. У пациентов группы 1 введение ГлК приводило к снижению выраженности болевого синдрома и основных симптомов заболевания на протяжении 6 мес после введения ГлК, с постепенным ухудшением состояния до исходного уровня через 12 мес. У пациентов группы 2 улучшение функции суставов по ВАШ и KOOS выявлялось как на ранних сроках (1 мес), так и в отдаленном периоде (12 мес) после терапии. В то же время положительный клинический эффект комбинированного введения СВФ и ГлК у пациентов группы 3 был сопоставим с эффектом СВФ.

Таким образом, внутрисуставное введение аутологичных клеток СВФ у пациентов с выраженными проявлениями ОА приводит к значимо более выраженному и длительному клиническому улучшению основных симптомов заболевания по сравнению с ГлК. Полученные предварительные данные свидетельствуют также об отсутствии значимого влияния ГлК на терапевтические эффекты СВФ.

Литература:

1. Honvo G., Reginster J.Y., Rannou F., et al. *Drugs Aging*. 2019. Vol. 36, N Suppl. 1. P. 101–127.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУЛЬПЫ И ПЕРИОДОНТА

А.В. Котова^{1,2,3}, **А.А. Лобов**¹, **Ю.А. Домбровская**², **Е.М. Приходько**^{2,3}, **В.И. Санникова**¹, **Н.А. Рюмина**³, **П. Клаузен**¹, **А.Л. Шаварда**⁴, **А.Б. Малашичева**¹, **Н.И. Енукашвили**^{1,2,3}

¹ ФГБУН Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Ресурсный центр РМИКТ, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: anastkotova@gmail.ru

Ключевые слова: стволовые клетки нервного гребня, стволовые клетки пульпы, протеом, остеогенная дифференцировка, масс-спектрометрия.

Стволовые клетки (СК) из разных тканей зуба, несмотря на общее происхождение от клеток нервного гребня, гетерогенны по своим свойствам. Они выполняют разные функции и, как следствие, обладают разными функциональными возможностями. Предполагается, что эти различия обусловлены влиянием на клетки их микроокружения — ниши.

Цель работы: оценка различий между СК пульпы (СКП) и СК периодонта (СКПд) по их морфофункциональным характеристикам, экспрессии маркеров плюрипотентности, остеогенной/одонтобластной дифференцировки и протеомному профилю в ходе данной дифференцировки.

Объектом исследования выступили пары культур клеток пульпы и периодонта, полученные от каждого из исследуемых доноров (всего 12 пар). Оказалось, что популяции СКП и СКПд обладают сходным набором поверхностных маркеров мезенхимных стволовых клеток, но отличаются по уровню экспрессии мРНК нестина (маркера нейроэктодермального происхождения), по уровню экспрессии эмбриональных маркеров, морфологии, скорости пролиферации и транскрипции генов остео-/одонтобластной дифференцировки. мРНК *OCT4* была обнаружена в СКП и СКПд, в то время как белок *OCT4* присутствовал только в ядрах СКП. Однако транскрипция мРНК *OCT4* в СК зубов была в 1000–10 000 раз ниже, чем в бластоцистах человека. СКП пролиферировали медленнее и обладали формой, близкой к полигональной, но они активнее реагировали на остеогенные стимулы по сравнению со СКПд. мРНК *RUNX2* была обнаружена с помощью кПЦР в обоих типах стволовых клеток, но в ходе протеомного анализа белок *RUNX2* оказался только в СКПд. Гены-маркеры одонтобластного типа остеогенной дифференцировки *DSPP* и *DMP1* транскрибировались в СКП, но не в СКПд.

Таким образом, мы показали различия стволовых клеток пульпы зуба и периодонта в экспрессии некоторых нейроэпителиальных и эмбриональных маркеров, морфологии клеток, пролиферативной активности, а также описали особенности остеогенной дифференцировки и отличия протеомных профилей во время неё. Поскольку СКП обладают гораздо более выраженным остеогенным потенциалом, они могут использоваться для ускорения восстановительных процессов в костной ткани и периодонте, а быстро пролиферирующие СКПд могут стать основой клеточных продуктов для других целей. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021).

МОДИФИКАЦИЯ АЛЬГИНАТНОГО ГИДРОГЕЛЯ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ

С.В. Кравченко¹, **В.В. Мясникова**^{1,2}, **С.Н. Сахнов**^{1,2}

¹ Краснодарский филиал ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза им. С.Н. Федорова Минздрава России, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

e-mail: ksv.1991@yandex.ru

Ключевые слова: биосовместимые гели, углеродные нанотрубки, гидрогель, альгинат натрия, токопроводящий биосовместимый гель, альгинатный гидрогель, орган на чипе.

Альгинатные гидрогели применяются в тканевой инженерии и регенеративной медицине благодаря

биосовместимости, способности имитировать механические и структурные свойства тканей, возможности обеспечивать диффузию кислорода и питательных веществ [1]. Токопроводящие биосовместимые гидрогели представляют существенный интерес при разработке биосовместимых имплантируемых электронных устройств [2]. Обладающие электропроводностью углеродные нанотрубки, являются биосовместимым материалом, имеющим потенциал для применения в тканевой инженерии [3].

Цель работы — оценка возможности получения альгинатного гидрогеля, содержащего углеродные нанотрубки.

В ходе работы в водный раствор альгината натрия перед полимеризацией вносились углеродные нанотрубки и субстанция тщательно перемешивалась, после чего из нее формировались пленки толщиной 2 мм и подвергались полимеризации хлоридом кальция. Полимерные гидрогелевые пленки, содержащие углеродные нанотрубки, демонстрировали меньшее электрическое сопротивление в сравнении с альгинатным гидрогелем без нанотрубок. Кроме того, нанотрубки не препятствовали полимеризации и не снижали стабильность гидрогеля.

Таким образом, полученные в рамках данной работы гидрогели на основе альгината, модифицированные углеродными нанотрубками, имеют потенциал для создания на их основе токопроводящих скаффолдов, тканевых инженерных конструкций и элементов систем орган-на-чипе для широкого спектра задач, в том числе, в сфере офтальмологии.

Литература:

1. Шамоян Г.М., Трофименко А.И., Каде А.Х. и др. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2018. № 1(65). С. 67–70.
2. Choi Y., Park K., Choi H. et al. *Polymers*. 2021. V. 13. № 7. P. 1133.
3. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнёв А.С. и др. Гены и клетки. 2011. Т. 6. № 1. С. 85–90.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ НЕЙРОНЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Н.А. Красковская^{1, 2}, М.Г. Хотин¹, Н.А. Михайлова¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: ninakraskovskaya@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Хантингтона, трансдифференцировка, нейроны, патология, дендритные шипики, мутантный хантингтин.

Поиск эффективных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, является актуальной задачей современной биологии и медицины. Для разработки эффективной терапии необходимо наиболее полное понимание молекулярно-клеточных основ патогенеза этих заболеваний с учетом особенностей течения заболевания у конкретного пациента. Ввиду того, что получить нейроны из мозга конкретного больного для подобных исследований не представляется возможным, актуальным инструментом стало применение методов перепрограммирования клеток. В настоящем

исследовании применялась методика трансдифференцировки для изучения патогенеза болезни Хантингтона (БХ). Мы усовершенствовали протокол на основе микроРНК и транскрипционных факторов MYT1L и NeuroD2[1] для получения популяции индуцированных возбуждающих нейронов (иВН) из дермальных фибробластов человека с эффективностью трансдифференцировки более 80 процентов для изучения когнитивных нарушений при болезни Хантингтона. В конце процедуры перепрограммирования иВН положительно окрашиваются на канонические нейронные маркеры и реагируют на стимуляцию хлоридом калия и глутаматом. Кроме того, иМСН и иВН способны образовывать дендритные шипики, что позволяет изучать дефекты синаптической передачи при развитии патологии БХ. Кроме того, в полученных нейронах от пациентов с БХ могут быть детектированы агрегаты мутантного белка хантингтина, что является отличительным признаком данной нейропатологии.

Усовершенствованный протокол может быть полезен как для изучения молекулярных и клеточных основ патогенеза БХ а так и для разработки персонализированного подхода к терапии данной нейропатологии. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-75-00106

Литература:

1. Richner M, Victor MB, Liu Y, Abernathy D, Yoo AS. *Nat Protoc*. 2015;10(10):1543-55

ЭПИМОРФНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ 3D-КРИОГЕЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ БИОРЕГУЛЯТОР, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЫКА

М.С. Краснов¹, А.П. Ильина³, А.И. Шайхалиев², Е.В. Сидорский¹, В.П. Ямскова³, В.И. Лозинский¹

¹ ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

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

³ ООО «Институт проблем биорегуляции», Москва, Россия.

e-mail: sneegr@gmail.com

Ключевые слова: биорегуляторы, криогели, 3D-технологии, остеогенез.

В настоящее время в травматологии продолжает оставаться актуальной проблема регенерации костной ткани при осложненных переломах конечностей, а также репарации костных дефектов в челюстно-лицевой хирургии как результата нарушения остеогенетических процессов. В настоящем исследовании была предпринята попытка разработки новых биотехнологий, в основе которых лежит дополнительная активация «собственных» клеточных источников регенерации. В этом аспекте новая группа эндогенных биорегуляторов, обнаруженных в межклеточном пространстве тканей животных, представляется исключительно перспективной. Во многих экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что они стимулируют восстановление и регенерацию в патологически измененных тканях из-за способности дополнительно активировать клеточные источники регенерации. В данном исследовании был изучен биорегулятор,

выделенный из сыворотки крови быка, основой которого является белково-пептидный комплекс (БПК-С), состоящий из изоформы сывороточного альбумина под номером gi|1351907 в базе данных Uniprot, биологически активных пептидов с мол. массами 1000–6000 Да и ионов Ca^{+2} . БПК-С в виде водного раствора вводили в 3D-носители, которые представляли собой криогенно-структурированные губки, приготовленные на основе альбумина сыворотки крови быка. Было проведено несколько экспериментальных серий *in vivo* на крысах Wistar или кроликах породы шиншилла, обоего пола, содержащихся в виварии Института биологии гена РАН. Животным наносили обширные экспериментальные травмы в области конечностей или нижней челюсти. В область повреждения вносили 3D-криогели, напитанные раствором БПК-С, биологическое действие которых оценивали, проводя гистологическое исследование области травмы на разных этапах репарации костного дефекта. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном регенеративном действии разработанных 3D-криогелей, содержащих БПК-С. При их применении, во-первых, было отмечено существенное опережение развития восстановительных остеогенетических процессов по сравнению с контрольными группами животных, которым 3D-криогели с БПК-С не имплантировали. Во-вторых, важным является качественное отличие регенерирующей костной ткани при воздействии 3D-криогели с БПК-С — в этом случае происходило восстановление костной ткани без формирования костной мозоли или ткани, отличной от нативной, восстанавливался костный мозг. Следует отметить, что 3D-криогели, не содержащие БПК-С, проявляют свойства остеокондукторов, способствуя миграции клеток в область травмы. Однако у животных этих экспериментальных групп не наблюдали эпиморфной регенерации в области дефекта. Важно, что при применении 3D-криогелей с БПК-С формирование новой костной ткани сопровождалось их полной деградацией без развития каких-либо негативных процессов, а БПК-С поддерживал статус дифференцировки и пролиферации клеток, не обладал токсическим, мутагенным, тератогенным и др. негативными действиями на организм.

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ СОСУДИСТЫЙ ПРОТЕЗ МАЛОГО ДИАМЕТРА: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

Е.О. Кривкина, А.В. Миронов, А.Р. Шабаев, М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, Е.А. Сенокосова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш

ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия.

e-mail: leonora92@mail.ru

Ключевые слова: спиннинг, атромбогенность, проангиогенные факторы, антиагреганты, антикоагулянты, поликапролактон, сосудистые протезы.

Материалы и методы. Сосудистые протезы Ø 4 мм были изготовлены методом электроспиннинга из полимерной композиции 5% полигидросибутирата/валериата (PHBV) и 10% поликапролактона (PCL) и комплекса проангиогенных факторов (GFmix): сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы (SDF-1 α). Дополнительно

проведена поверхностная модификация протезов гепарином (Hep) и илопростом (Ilo) по оригинальной методике [1]. Преκлинические испытания протезов выполнены на модели овцы. Опытную группу — протезы PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} (n=8), срок имплантации — 12 месяцев. Группа сравнения — протезы Gore-Tex Ø 4 мм (Gore-Tex, США) (n=5), срок имплантации — 6 месяцев. Контрольная группа — животные с аутоартериальной имплантацией сроком на 12 месяцев (n=8).

Результаты. Проходимость сонных артерий овец спустя 12 месяцев после проведения аутоартериальной имплантации составила 87,5%. Итоговая проходимость сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} составила 50%, а синтетических протезов Gore-Tex — 0%. Гистологическое исследование показало полную биорезорбцию каркаса PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} с образованием аневризматически расширенного новообразованного сосуда, схожего по строению с нативной сонной артерией овцы. Однако по отличие от нативного сосуда, в новообразованной ткани отсутствовали эластические волокна. В стенках протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} не обнаружен кальций, тогда как стенки Gore-Tex подверглись массивной кальцификации. При иммунофлуоресцентном исследовании в эксплантированных протезах PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} подтверждено формирование трехслойной сосудистой ткани, содержащей эндотелиальный, гладкомышечный и адвентициальный слои, наличие коллагенов I, III и IV типов. На основе протезов Gore-Tex новообразованная сосудистая ткань отсутствовала.

Выводы. Биodeградируемые сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} обладают высокой долгосрочной проходимостью (в сравнении с синтетическими протезами Gore-Tex). Отсутствие кальцификации в протезах PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} подтверждает их высокую биосовместимость. Однако факт аневризмообразования требует проведения дополнительного укрепления каркаса протеза. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001.

Литература:

1. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А. и др. Пат. 2702239(RU); № 2019119912; заявл. 25.06.2019; опубл. 07.10.2019, Бюл. № 28.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОСТНЫХ ЦЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ ФОСФАТ КАЛЬЦИЯ-ФОСФАТ МАГНИЯ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭФФЕКТОМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

П.А. Крохичева, М.А. Гольдберг, В.С. Комлев

ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

e-mail: polinariakroh@gmail.com

Ключевые слова: Костный цемент, биосовместимость.

Работа посвящена получению и изучению нового цементного материала на основе системы фосфат магния — фосфат кальция допированного катионом Ag с антибактериальным эффектом для применения в реконструктивно-восстановительной хирургии. Были исследованы структурно-фазовое состояние,

морфология, физико-химические свойства и механические, а также антибактериальная активность цементного материала, представлены исследования *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что введение 1 мас.% Ag приводит к повышению прочности и увеличению растворимости, такой материал является полностью биосовместимым и проявляет умеренные матриксные свойства. При этом, наблюдалась антибактериальная активность в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) и *Escherichia coli* (*E. coli*) с зоной подавления диаметром 8 мм. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что новый разрабатываемый костный цемент можно использовать в качестве потенциального материала для замещения костных дефектов для улучшения регенерации кости.

Костные цементы на основе фосфатов магния (МКФЦ) рассматриваются как альтернатива материалам на основе фосфатов кальция (КФЦ) в реконструктивной хирургии [1,2]. Инфекции, связанные с имплантатами, представляют собой серьезную проблему в костной хирургии. Инфекционные осложнения могут привести к развитию хронического остеомиелита, а в случае генерализации инфекции и развития синдрома системной воспалительной реакции или сепсиса — к летальному исходу. Костный цемент, допированный катионами, характеризуется более длительным периодом антимикробного действия за счет вхождения в структуру и более медленного высвобождения катионов [3].

Теория. Одной из современных задач при разработке костных цементов нового поколения является обеспечение и усиление пролонгированного антибактериального эффекта. Альтернативным подходом к получению таких материалов является допирование МКФЦ и КФЦ антимикробными ионами. Ожидается, что костные цементы, допированные Ag, содержащие ионы Mg и Ca, будут демонстрировать хорошую биосовместимость, способность к полной резорбции в организме, биологическую активность в отношении формирования костного матрикса в процессе остеогенеза и обладать антибактериальным эффектом.

МКФЦ получали осаждением из водного раствора солей, катионы Ag вводили в количестве 0,5 и 1 мас.%. Прочность образцов цементов при сжатии измеряли на приборе Instron 558. Исследования растворения проводили путем замачивания образцов цемента в модельных жидкостях Kokubo SBF и фосфатно-солевом растворе Дульбекко (DPBS) в течение 28 дней в закрытой системе при температуре 37°C. Исследование антибактериальной активности проводили в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli* путем погружения в агар. Исследования биосовместимости и остеокондуктивных свойств проводили на модели подкожной имплантации мышам и резекции большеберцовой кости у крыс в сроки 3, 6 и 12 недель. Биологические свойства костных цементов оценивали с помощью микрокомпьютерного томографа Skyscan 1275 (Bruker, Бельгия) и гистологических срезов образцов.

Таким образом, были получены новые МКФЦ, допированные катионами серебра, характеризующиеся цементирующей фазой — Струвит. Цементные материалы обладают нейтральным уровнем pH, временем схватывания 4–7 мин., плотной микроструктурой и высокой механической прочностью 43 МПа. При исследованиях растворения установлено, что допирование катионами приводит к снижению растворимости материалов. На поверхности образцов к 14-м суткам эксперимента образуется минеральная фаза природного происхождения — Бобьерит. Цементные материалы проявляют

антибактериальный эффект в отношении *S. aureus* и *E. coli*. По макро- и микропризнакам цементные материалы полностью биосовместимы, к 6-й неделе наблюдается формирование новой костной ткани.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-33-70079.

Литература:

1. Goldberg M.A. et al. *Bioactive Materials*. — 2020. — Т. 5. — № 3. — P. 644–658.
2. Kroklicheva P.A. et al. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. — 2021. — Т. 66. — № 8. — P. 1079–1090.
3. Santos G.G. et al. *Brazilian journal of biology*. — 2020. — Т. 81. — P. 53–61.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИРОИДНЫХ PLA-СКАФФОЛДОВ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНЫХ ТКАНЕЙ

А.Е. Крупнин¹, И.А. Чичаев¹,
С.В. Крашенинников¹, М.М. Алексанян²,
О.А. Спирин², Н.Г. Седуш¹, С.Н. Чвалун¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: artkrupnin@gmail.com

Ключевые слова: регенеративная медицина, гироид, FDM-печать, полилактид (PLA), скаффолды, механические свойства.

Для восстановления дефектов костных тканей в регенеративной медицине широко применяются пористые каркасы-скаффолды, выступающие в роли скелета для клеток. Помимо требований нетоксичности, предъявляемых к биосовместимым биоразлагаемым скаффолдам, они должны обладать достаточной для диффузии питательных веществ и удаления продуктов жизнедеятельности, пористостью и сопоставимыми с нативной костной тканью механическими свойствами [1]. Известно, что оптимальная интеграция достигается при значениях диаметра пор в диапазоне от 200 до 1600 микрон [2]. При этом пористость нативной губчатой костной ткани изменяется в диапазоне от 50 до 90% [3]. Механические свойства нативной губчатой костной ткани при сжатии изменяются от 3,5 МПа до 1200 МПа и от 0,22 МПа до 10,44 МПа для модуля Юнга и предела текучести/прочности, соответственно [4, 5]. Широкое распространение получили конструкции каркасов на основе гироидной поверхности, изготавливаемые с применением технологии FDM-печати [2, 3, 5].

В данной работе проведено экспериментальное исследование влияния геометрических параметров скаффолдов на механические характеристики в испытаниях на одноосное сжатие. Трехмерные модели скаффолдов со значениями пористости в диапазоне 50–83% построены в программном комплексе Wolfram Mathematica с последующим экспортом в формате stl для подготовки к 3D-печати. В качестве материала образцов скаффолдов использовался коммерческий полилактид eSun PLA+ в виде прутка диаметром 1,75 мм. Температура экструдера и печатного стола выбраны 210°C и 65°C, соответственно; высота слоя 0,25 мм, скорость печати 35 мм/с. Для 3D-печати использовался FDM 3D-принтер Raise3D PRO2. Механические испытания проводились на машине INSTRON 5965 при температуре 37°C в соответствии

со стандартом ASTM D695-15. Для изготовленных скаффолдов значения модуля упругости и предела текучести изменялись в диапазоне от 4,67 МПа до 340 МПа и от 0,25 МПа до 12,6 МПа. Изменение геометрических параметров моделей позволяет настраивать механические свойства изделий в широком диапазоне в соответствии со свойствами нативной губчатой костной ткани, что делает гироидные скаффолды перспективными при восстановлении костных дефектов.

Литература:

1. Lasprilla A. et al. *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. № 1. P. 321.
2. Alizadeh-Osgouei M. et al. *Smart Materials in Medicine.* 2021. V. 2. P. 15.
3. Tripathi Y. et al. *J. Mater. Eng. Perform.* 2019. V. 28. P. 7445.
4. Misch C.E., Qu Z, Bidez M.W. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999. V. 57. P. 700.
5. Wang, Haoze, et al. *Addit. Manuf.* 2022. V. 57. Art. № 102961.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПЕРИКАРДА

**А.Д. Кручинина¹, Ю.А. Глумскова²,
А.А. Венедиктов²**

¹ ФГБОУ ВО Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

² ООО «Кардиоплант», Пенза, Россия

e-mail: a.d.kruchinina@mail.ru

Ключевые слова: биоматериал, децеллюляризация, перикард, бесклеточный коллагеновый матрикс, направленная регенерация тканей, биосовместимость, тканевая инженерия.

В настоящее время потребность в материалах для направленной регенерации тканей и тканевой инженерии достаточно высока. Ключевым требованием является низкая иммуногенность. Различные способы децеллюляризации (химический, ферментативный, физический) позволяют получить бесклеточный материал [1], содержащий основные компоненты внеклеточного матрикса: коллагены, эластин, протеогликаны, интегрины, фибронектины и др [2].

В исследовании образцы бесклеточных коллагеновых матриксов на основе перикарда были получены разными методами децеллюляризации: ферментативным трипсином, химическим с помощью гипертонических растворов и додецилсульфата натрия.

Эффективность способа децеллюляризации определяли по количественному содержанию ДНК методом адсорбционной спектрофотометрии при длине волны 260 нм. Цитотоксическое действие материалов изучали на мезенхимальных стромальных клетках костного мозга человека. Оценка микрорельефа поверхности проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Для гистологического анализа использовали дифференциальную трехцветную окраску по Лилли. Исследование потенциальной индукции окислительного стресса оценивали по флуоресценции зонда DCFHDA (Ex 485нм/Em530нм) в культивируемых клетках.

Установлено, что все способы удаления клеток являются эффективными и позволяют получить бесклеточный материал. Процесс обработки оказывает выраженное повреждающее влияние на ультраструктуру и целостность компонентов внеклеточного матрикса. Материалы не являются цитотоксичными, но способны индуцировать внутриклеточный окислительный стресс.

Литература:

1. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C. et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016. V. 97. P. 4–27.
2. Mendibil U., Ruiz-Hernandez R., Retegi-Carrion S. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 15. P. 5447.

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА АРТЕРИЯХ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

**А.А. Крылов, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков,
А.С. Пшенников, Н.Д. Мжаванадзе**

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

e-mail: andrewkrylov1992@gmail.com

Ключевые слова: атеросклероз, критическая ишемия, ангиогенез, факторы роста, терапевтический ангиогенез.

Методом выбора для лечения пациентов с критической ишемией является оперативное вмешательство (прямая реваскуляризация) с помощью открытых, либо эндоваскулярных методик. Однако отдаленные результаты хирургического лечения оставляют желать лучшего. Процессы ангиогенеза в основном регулируются такими проангиогенными цитокинами, как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор (PDGF), гипоксией индуцируемый фактор 1 альфа (HIF-1 α) и другими [1]. В процессе ангиогенеза появление коллатеральных связей после окклюзии артерии происходит в период от 4–6 недель, что обусловлено недостаточной выработкой проангиогенных факторов роста при хронической ишемии, поэтому может потребоваться их экзогенное введение [2].

В работе определялись ангиогенные факторы у 30 прооперированных пациентов с критической ишемией. У всех пациентов выполнялся забор крови до операции, на 5–7 сутки, через 1, 6 и 12 месяцев с момента операции.

Показатель VEGF, составляющий до операции $818,4 \pm 332$ пг/мл прогрессивно снижался в послеоперационном периоде ($603,5 \pm 216,8$ на 7-е сутки, $p=0,426$) достигая минимальных значений через 1 месяц наблюдения ($483,3 \pm 226,6$, $p=0,062$), в последующем имел место прирост к 6 месяцам ($715 \pm 199,9$, $p=0,002$) с повторным снижением к 1 году ($515 \pm 104,2$, $p=0,005$). Таким образом в течение всего срока наблюдения динамика VEGF была непостоянной в виде волны со снижением к 1 месяцу и 1 году и подъемом к 6 месяцам. При этом относительно исходного значения статистически достоверная разница снижения VEGF была получена только с визитом в 1 месяц $p=0,039$.

При оценке PDGF-BB на было выявлено достоверных различий между группами в течение наблюдения, однако в абсолютных цифрах можно проследить следующую тенденцию: относительно исходного предоперационного уровня PDGF-BB ($3511,3 \pm 1508$ пг/мл) в раннем послеоперационном периоде (5–7 сутки) наблюдалось его значительное снижение до $3013,5 \pm 1989$, с последующим увеличением до 3948 ± 1516 к 1 месяцу и повторное снижение до $3270 \pm 810,8$ к 6 месяцам и 1 году наблюдения.

Таким образом можно отметить тенденцию к снижению факторов роста в раннем послеоперационном периоде, что может быть связано с купированием явлений

ишемии с последующим восстановлением их уровня к 6 месяцам (компенсаторная реакция организма) и дальнейшей тенденцией к повторному снижению. Исходя из динамики показателей наиболее перспективным представляется экзогенная стимуляция ангиогенеза в раннем послеоперационном периоде и через 6 месяцев после перенесенного оперативного вмешательства. Работа выполнена в рамках реализации гранта Президента Российской Федерации МК-1393.2021.3.

Литература:

1. Cook K.M., Figg W.D. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(4): 222–243.
2. Carmeliet P., Collen D. *J Pathol.* 2000; 190(3): 387–405.

ЦИСПЛАТИН-СОДЕРЖАЩИЙ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ОКФ И БИСФОСФОНАТА — БИОАКТИВНОСТЬ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

**Е.А. Кувшинова¹, Н.В. Петракова²,
С.А. Ахмедова¹, В.А. Кирсанова¹,
И.К. Свиридова¹, Н.С. Сергеева¹, В.С. Комлев²**

¹ МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

e-mail: beliy@mail.ru

Ключевые слова: октакальциевый фосфат, функционализация, цисплатин, золедроновая кислота, остеоиндукция, противоопухолевые свойства, реконструктивная хирургия.

Работа посвящена разработке нового метода функционализации октакальциевого фосфата (ОКФ) цисплатином (Цис) в сочетании с золедроновой кислотой (Зол), с целью создания остеопластического материала с пролонгированным противоопухолевым действием для реконструкции костных дефектов в онкологии.

Функционализацию осуществляли путем адсорбции Цис (из раствора с его концентрацией в 1 мг/мл) на поверхность гранулированной ОКФ-керамики в присутствии в исходном растворе Зол, в концентрациях 0, 0,2, 0,5 и 1 мг/мл (полученный материал — ОКФ-Цис, ОКФ-Цис/Зол-0,2, ОКФ-Цис/Зол-0,5, ОКФ-Цис/Зол-1, соответственно). Зол использовали в качестве линкера для присоединения цисплатина к поверхности ОКФ, обеспечивающего прочность связывания и его более длительное высвобождение.

Показано, что эффективность инкорпорации Цис в ОКФ имела обратную зависимость от содержания Зол в исходном растворе. Так, при увеличении концентрации Зол от 0 до 1 мг/мл в исходном растворе количество связанного с ОКФ Цис снижалось с 10,1 до 7,7 мкг на 1 мг ОКФ. Но при этом также уменьшалось и соотношение высвобожденного и инкорпорированного Цис. Из ОКФ-Цис за 5 недель вышло 96% цитостатика, из ОКФ-Цис/Зол-0,2 — 77,5%, из ОКФ-Цис/Зол-0,5 — 53,8% и из ОКФ-Цис/Зол-1 — 34,5%.

В исследованиях *in vitro* показано усиление остеоиндуктивных свойств и проявление ингибирующего остеокластов действия у ОКФ керамики, функционализированной Зол. На клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 продемонстрированы цитостатические свойства Цис-содержащей ОКФ-керамики, наиболее выраженные у ОКФ-Цис, ОКФ-Цис/Зол-0,2 и ОКФ-Цис/Зол-0,5. При этом максимальная длительность действия

была у ОКФ-Цис/Зол-0,5, что обосновало его дальнейшее изучение в экспериментах на животных.

В исследованиях *in vivo* показана биосовместимость разработанных материалов. При их имплантации в костный дефект, наиболее выраженный остеогенез вызывала чистая ОКФ-керамика, тогда как функционализация материала Цис и Зол привела к замедлению регенеративных процессов в костной ткани. На модели подкожной опухолевой инокуляции мышам функционализированная Цис и Цис/Зол керамика продемонстрировала выраженные противоопухолевые свойства.

Таким образом, разработанный метод функционализации ОКФ-керамики Цис в сочетании с Зол обеспечивает материалу пролонгированные противоопухолевые свойства, что обосновывает его применение в реконструктивной хирургии костной ткани в онкологии.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ НИША И ВРЕМЕННОЕ ОКНО — НЕОБХОДИМЫЕ УСЛОВИЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С.М. Кузин

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

e-mail: smkuzin@mail.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, мутации, генетическая нестабильность, циркадианный ритм, пролиферация клеток, пространственная ниша, временное окно.

Одной из основных причин, ограничивающих применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, является генетическая нестабильность и связанная с ней риск канцерогенеза. Тщательный контроль, включая полногеномное секвенирование, не позволяет охватить все клоны клеток, каждый из которых имеет свой спектр мутаций, а удаление недифференцированных клеток ограничивает возможности регенерации обновляющихся тканей. Поэтому для решения проблемы необходимо выявление причин появления генетической нестабильности при культивировании клеток.

Целью работы было изучение в обновляющихся тканях пространственных и временных закономерностей пролиферации нормальных и мутантных клеток, нарушение которых может приводить к генетической нестабильности. В эпителии пищевода мышей и красного костного мозга джунгарских хомячков определяли: циркадианные ритмы ДНК-синтезирующих и делящихся клеток, длительность клеточного цикла и отдельных его периодов, пространственное расположение пролиферирующих и дифференцирующихся клеток. Мутации индуцировали действием тиотетпа. Генетические нарушения определяли в тестах на хромосомные aberrации и сестринские хроматидные обмены (СХО). Для определения СХО и параметров кинетики клеток использовали методы дифференциальной окраски хромосом и радиоавтографии с применением 5-бромдезоксимуридина и ³H-тимидина.

Полученные результаты показали, что стволовые клетки входят в G0 период митотического цикла, проходят подготовку к митозу и делятся в строго определенный период времени, совпадающий с активной фазой циркадианного ритма пролиферации. Таким образом, наряду с особым пространственным расположением — нишей, они обладают специфической временной характеристикой пролиферативных процессов, названной нами «временным окном».

Ранее было показано, что клетки с генетическими нарушениями могут преодолевать контрольные точечные циклы, но вступают в митоз с задержкой [1, 2]. По нашим данным, временные и пространственные характеристики взаимосвязаны: задержка деления клеток на 3–6 часов значительно (на 30%) увеличивает вероятность выхода стволовых клеток из ниши, что ведет к их последующей дифференцировке и элиминации из ткани. Таким образом, задержка мутантных клеток в митотическом цикле — выпадение их из временного окна пролиферации, ведет к повышенной вероятности элиминации из ткани и постепенной замене на клетки без нарушений. Можно сделать вывод, что строго определенная пространственно-временная организация обновляющихся тканей, наличие временного окна пролиферации и ниши, позволяют поддерживать генетический гомеостаз, а их нарушение может являться причиной генетической нестабильности при культивировании клеток.

Литература:

1. Кузин С.М., Стукалов С.В. Гены и клетки. 2017. Т. 12. № 3. С. 139.
2. Kuzin S., Bogomolov D., Berechikidze I. et al. *Pharmacia*. 2022. V. 69(2). P. 327.

БИОСОВМЕСТИМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ЛАКТИДА И ОКСИДА ЭТИЛЕНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Е.В. Кузнецова¹, Ю.А. Пучкова¹, Е.В. Ястремский¹, А.В. Бакиров^{1,2}, С.Н. Чвалун^{1,2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

e-mail: kuznetsova.kate992@gmail.com

Ключевые слова: самоорганизация, полимерные наночастицы, полилактид, полиэтиленоксид, тканевая инженерия, агрегативная устойчивость, коллоиды.

Активное развитие нанотехнологий в XXI веке привело к существенному прогрессу в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. Так, биосовместимые наночастицы (НЧ) с регулируемыми физико-химическими характеристиками являются перспективным наполнителем для клеточных матриц (скаффолдов). В зависимости от биомедицинских задач, например, придания антимикробных свойств скаффолду, обеспечения контраста для визуализации, повышения биоактивности и др., используют различные типы НЧ: золотые, серебряные, кремнийсодержащие, кальций фосфатные, магнитные, а также частицы на основе биосовместимых природных и синтетических полимеров и др. [1]. Полимерные НЧ, способные инкапсулировать различные биологически-активные вещества, представляют особый интерес ввиду возможности регулирования их свойств (размера, формы, поверхностного заряда, сорбционной емкости, скорости разложения, скорости высвобождения загруженного вещества и пр.) в широком диапазоне за счет изменения химического состава полимера и/или условий получения частиц [2].

В представленной работе объектами исследования стали НЧ на основе биосовместимых и биodeградируемых амфифильных блок-сополимеров поли(лактид)-*б*-поли(этиленоксид) (ПЛА-*б*-ПЭО). Изучено влияние стереоспецифичности гидрофобного ПЛА блока на размер ПЛА-*б*-ПЭО частиц, их форму, величину

электрокинетического потенциала, сорбционную емкость и агрегативную устойчивость с целью получения высокостабильных НЧ. Частицы получали методом наноосаждения: навеску блок-сополимера растворяли в ацетоне, к полученному раствору добавляли воду, ацетон удаляли испарением при комнатной температуре в течение 4 ч. В результате получали опалесцирующие водные дисперсии частиц на основе нестереорегулярного аморфного П(D,L)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ сополимера, а также стереорегулярного частично кристаллического П(L,L)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ сополимера и эквимольной смеси стереорегулярных П(L,L)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ и П(D,D)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ сополимеров. Показано, что эквимольное смешение П(L,L)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ и П(D,D)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ сополимеров приводит к формированию сферических частиц с частично кристаллическим ядром, гидродинамическим диаметром ~ 30 нм, величина которого остается постоянной (в рамках экспериментальной погрешности) в течение месяца как при 25 °С, так и при 37 °С. Установлено, что полученные П(L,L)ЛА₅₀/П(D,D)ЛА₅₀-*б*-ПЭО₁₁₃ частицы стабильны в достаточно широком диапазоне ионной силы и pH, а также способны к ресуспендированию до исходных размеров после лиофилизации. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда (проект № 21-73-00071).

Литература:

1. Fathi-Achachelouei M., Knopf-Marques H., Ribeiro da Silve C.E. *Front. Biotechnol.* 2019. V. 7. Art. № 113.
2. Sedush N.G., Kadina Y.A., Razuvaeva E.V. et al. *Nanobiotechnology Reports*. 2021. V. 16. P. 421–438.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *POU5F1* В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

А.А. Кузьмин¹, В.В. Кудряшов², А.Н. Томилин¹

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: a.kuzmin@incras.ru

Ключевые слова: *Pou5f1*, фактор плюрипотентности, раковые клетки, CRISPR.

Фактор плюрипотентности Oct4, кодируемый геном *Pou5f1* представляет собой октамер-связывающий белок, который в роли транскрипционного фактора выступает в качестве одного из основных факторов поддержания плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток [1, 2]. В последнее время накапливается всё больше информации о том, что этот транскрипционный фактор, и его ген, в частности, могут быть активны не только в плюрипотентных и половых клетках, но и в клетках совершенно иной спецификации [3].

В настоящее время нами ведутся работы по поиску экспрессии *Pou5f1* в клетках, прошедших стадию плюрипотентности. При помощи системы CRISPR/Cas9 и целенаправленного встраивания селективной конструкции в локус *Pou5f1* мы обнаружили, что разные раковые клетки мыши способны поддерживать активный статус этого гена. Более того, взяв широкий спектр различных линий, мы получили первичные данные, говорящие о том, что экспрессия *Pou5f1* может носить избирательный характер в отношении раковых клеток.

В настоящий момент мы работаем над характеристикой продуктов экспрессии этого гена, а также над выяснением универсальных механизмов, обеспечивающих

его работу. Кроме этого, интересным направлением является выяснение функциональной значимости экспрессии *Rou5f1* в раковых клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

Литература:

1. Schöler, H. R., Balling, R., Hatzopoulos, A. K. et al. The EMBO journal. 1989. V. 8. P. 2551.
2. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K. et al. Cell. 1998. V. 95. P. 379.
3. Cherepanova, O. A., Gomez, D., Shankman, L. S. et al. Nature medicine. 2016. V. 22. P. 657.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО РЕЦЕПТОРА (CASR) В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОПОРОЗА

К.А. Кулакова, О.А. Краснова, Д.А. Костина, А.П. Домнина, Ю.В. Сопова, И.Э. Неганова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: karina.kulakova.O1@mail.ru

Ключевые слова: остеопороз, GPCR, иПСК, CaSR, остеогенная дифференцировка.

Ремоделирование костной ткани — непрерывный процесс резорбции кости остеокластами и костеобразования остеобластами. Это способствует как поддержанию гомеостаза костной ткани (КТ), так и устранению повреждений в результате механического стресса. Однако, смещение равновесия в сторону резорбции связано с патогенезом остеопороза, системным метаболическим заболеванием, характеризующимся снижением плотности костной массы и нарушением внутренней структуры КТ. Важную роль в развитии и обновлении КТ играют рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled receptors, GPCRs). Мутации, связанные с GPCRs ассоциированы с заболеваниями и дисфункцией костей. Одним из эффекторов ремоделирования костной ткани является кальций-чувствительный рецептор (calcium-sensing receptor, CaSR), относящийся к классу глутаматных GPCRs. Так, повышение концентрации кальция в результате резорбции КТ остеокластами приводит к подавлению функции последних и стимулированию остеобластов, что приводит к активации костеобразования. Пациенты с аутосомно-рецессивным нарушением гомеостаза кальция характеризуются обширной потерей костной массы при рождении; у них может возникать деминерализация и переломы костей [1].

Цель данного исследования заключается в выяснение функционального значения CaSR при остеопорозе. В данной работе нами были использованы методы дифференцирования пациент-специфичных (CASR) и контрольных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в мезенхимальные стволовые клетки (иМСК); последующее остеогенное дифференцирование CASR-иМСК и контрольных иМСК; анализ и сравнение экспрессии генов остеогенных маркеров *RUNX2*, *COL1A1*, *BGLAP*, *SPP1*, *OGN* и *POSTN*; окрашивание на щелочную фосфатазу и депозитов кальция с использованием ализаринового красителя.

Показано, что через 21 день остеогенной дифференцировки (ОД) CASR-иМСК характеризовались низким уровнем экспрессии *RUNX2*, *COL1A1*, *BGLAP*, *SPP1*,

OGN и *POSTN* по сравнению с контрольными иМСК. Также при ОД CASR-иМСК характеризовались негативным окрашиванием на щелочную фосфатазу (ЩФ) и кальциевые депозиты, что вероятно говорит о неспособности CASR-иМСК дифференцироваться в остеогенном направлении. При ОД контрольные иМСК имели положительное окрашивание на ЩФ и ализариновый красный, уровень окрашивания которым характеризует плотность минерализации.

Предварительные данные свидетельствуют о том, что МСК, полученные от пациент-специфичных иПСК с дисфункцией CaSR не способны эффективно дифференцироваться в остеогенном направлении, что напрямую может быть связано с патогенезом остеопороза. Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

Литература:

1. Panova A. V., Kulikova K.S., Klementieva N.V. et al. Stem cell research. 2021. (54). С. 102414.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ МСК И ИХ РОЛЬ В КОНТРОЛЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

К.Ю. Кулебякин^{1,2}, Е.Р. Корчагина¹, Н.С. Волошин¹, И.А. Скляник³, Е.А. Шестакова³

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет Фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУ НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

Ключевые слова: МСК, адипогенез, инсулиновый рецептор, инсулинорезистентность.

Определяющую роль в контроле энергетического гомеостаза организма играет жировая ткань. Это уникальный орган, активно обновляющийся в течение жизни и динамически подстраивающийся под метаболический статус организма. Обновление жировой ткани обеспечивается особой группой постнатальных стволовых клеток — мезенхимными стволовыми клетками. Эти клетки являются предшественниками основной массы вновь появляющихся адипоцитов во взрослом организме, продуцируют внеклеточный матрикс, определяющий структуру ткани, а также контролируют тканевой метаболизм за счет продукции паракринных и аутокринных сигнальных молекул. Данные последних лет говорят, что популяция МСК является крайне гетерогенной в функциональном плане. Мы показали, что в ее состав входят субпопуляции клеток, различные на функциональном уровне и по чувствительности к гормонам-регуляторам. При этом клетка, воспроизводимо отвечающая на один гормон, оказывается нечувствительной к другим гормонам. Недавно была описана особая субпопуляция МСК, подавляющая адипогенную дифференцировку других клеток жировой ткани посредством продукции паракринных сигналов [1, 2]. Это позволяет предположить, что в популяции МСК могут существовать особые регуляторные субпопуляции клеток, обладающие чувствительностью к определенным гормонам и способные «передавать» гормональный сигнал клеткам через продукцию

паракринных факторов. Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы смогли выделить малую субпопуляцию клеток, несущих на своей поверхности рецептор к инсулину. Несмотря на то, что данные клетки составляют менее 15% от общего числа МСК, оказалось, что удаление этих клеток из популяции практически полностью лишает МСК способности дифференцироваться в клетки жировой ткани. Примечательно, что сами по себе клетки, несущие на поверхности рецептор к инсулину и способные воспринимать сигналы от основного регулятора закладки новых адипоцитов, оказались не способны к адипогенной дифференцировке. При этом в условиях сокультивирования, когда группы клеток, имеющие и не имеющие инсулиновый рецептор на своей поверхности, были разделены полупроницаемой мембраной, препятствующей прямым контактам между клетками, но позволяющей передачу растворимых факторов, таких как сигнальные белки, микроРНК и клеточные везикулы, в популяции, не несущей инсулиновый рецептор, происходило полное восстановление способности к дифференцировке в адипоциты. Это позволяет предположить, что малая популяция, несущая инсулиновый рецептор, представляет собой специализированные клетки-регуляторы адипогенной дифференцировки, которые сами не дифференцируются в жировые клетки, но управляют и «дирижируют» остальными клетками в популяции, определяя формирование новых адипоцитов. Работа выполнена при поддержке фонда РФФ (Грант № 21-15-00311, Механизмы межклеточной коммуникации в поддержании гомеостаза и регуляции обновления жировой ткани).

Литература:

1. Schwalie PC, Dong H, Zachara M, Nature. 2018 Jul; 559 (7712): 103–108.
2. Zachara M, Rainer PY, Hashimi H. EMBO J. 2022 Aug 22:e108206.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ, В СОСТАВЕ ФРАКЦИЙ СЕКРЕТОМА МСК

**М.А. Кулебякина¹, Д.А. Бутузова¹,
М.С. Арбатский¹, Н.А. Басалова^{1,2},
О.И. Клычников³, А.Ю. Ефименко^{1,2}**

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

² Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

e-mail: coolebyakina@gmail.com

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, секретом, фиброз.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) регулируют процессы заживления тканей после повреждения, секретируя большое количество биологически активных веществ, в том числе белковой природы. Поэтому создание препаратов на основе секретомы МСК является перспективным направлением регенеративной медицины. Ранее нами было показано, что разделение кондиционированной среды (КС) МСК на фракции внеклеточных везикул (ВВ) и растворимых факторов (РФ) существенно увеличивает антифибротический эффект

получаемых компонентов секретомы в модели TGF β -индуцированной дифференцировки фибробластов кожи человека в миофибробласты. Предположительно, фракционирование приводит к обогащению ВВ и РФ антифибротическими и к обеднению профибротическими компонентами. С целью проверить данную гипотезу, а также предположить возможные механизмы действия белковых компонентов секретомы МСК на дифференцировку фибробластов, мы провели сравнительный полуквантитативный анализ белкового состава образцов секретомы МСК. Для этого мы использовали КС иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT-ASC, ATCC). Выделение фракций ВВ и РФ секретомы МСК, а также концентрирование нефракционированной КС проводили методом ультрафильтрации. Из полученных препаратов готовили образцы триптических пептидов, которые затем подвергали хромато-масс-спектрометрическому анализу на приборе Q Exactive HF-X. Биоинформатическую обработку данных проводили с использованием ПО MaxQuant. Результаты протеомного анализа верифицировали методом вестерн-блоттинга.

Всего было идентифицировано 563 белка, из них 343 различались по представленности между фракциями секретомы МСК в два и более раза. Мы обнаружили, что фракции ВВ и РФ обогащены белками, взаимодействующими с сигнальными путями TGF β , а также Notch и Wnt. Предположительно, антифибротический эффект фракций ВВ и РФ может реализовываться за счет более выраженного воздействия на данные сигнальные пути. Кроме того, мы обнаружили, что КС обогащена относительно ВВ и РФ 107 белками, 10 из которых (F10, MIF, SDF-1 и др.) способны активировать провоспалительный транскрипционный фактор NF- κ B. Находясь в составе КС, эти белки могут препятствовать антифибротическому эффекту других компонентов секретомы МСК. Методом ПЦР в реальном времени мы подтвердили, что добавление КС, но не ВВ либо РФ, вызывает увеличение экспрессии мишеней NF- κ B (CXCL1, IL1- β и др.) в фибробластах кожи человека. Таким образом, фракционирование увеличивает антифибротические свойства секретомы МСК, в частности, за счет снижения содержания белков, стимулирующих экспрессию провоспалительных факторов. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 19-75-30007).

БЕСКОНТАКТНЫЙ МЕТОД МОНИТОРИНГА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

**О.Р. Куликова¹, Е.О. Осидак², К.Г. Антипова³,
С.В. Крашенинников³, Д.Ю. Бедник⁴,
Т.Е. Григорьев^{3,4}, Е.А. Храмова¹**

¹ Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля
РАН, Москва, Россия

² ООО фирма «Имтек», Москва, Россия

³ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

e-mail: olga.kulikova.2012@list.ru

Ключевые слова: коллаген, гидрогелевый матрикс, акустическая микроскопия, искусственная роговица/

Тканевая инженерия направлена на восстановление, поддержание, улучшение или замену поврежденных биологических тканей с использованием тканеинженерных

конструкций. Инновационным направлением применения гидрогелевых матриц на основе коллагена является создание искусственной роговицы [1]. Коллагеновые гидрогели оптически прозрачны и обладают слабой механической прочностью, характеристика их свойств вызывает большие сложности [2, 3].

В работе проводилось исследование гидрогелевых мембран для восстановления роговицы на основе коллагена I типа (Viscoll®, PN3, ООО фирмы «Имтек»). Исследование было выполнено на ультразвуковом микроскопе высокого разрешения SIAM-2010. В качестве кондиционирующих сред для набухания использовались: дистиллированная вода, инфузионный раствор NaCl 0,9%, раствор Рингера и среда для культивирования Gibco RPMI Medium 1640. Измерение механических свойств и визуализация проведены в режимах В- и С-сканирования.

По итогам экспериментов была произведена оценка динамики набухания гидрогелевых матриц на основе коллагена по изменению объема и массы образцов в разных растворах в заданные временные промежутки.

Метод акустической микроскопии показал высокую эффективность для бесконтактного мониторинга изменения геометрии и упругих свойств мембран. Полученные данные необходимы для прогнозирования итоговых размеров и поведения импланта *in vivo*.

Работа выполнена на основе бюджетного финансирования в рамках темы № 1201253306, анализ механических свойств — при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Андреев Ю.В., Андреев А.Ю., Домогатский С.П. и др. Гены & Клетки XIV, 2019; С. 22.
2. Ricard-Blum S. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1; 3 (1).
3. Andreev A.Y., Osidak E.O., Grigoriev T.E et al. Exp Eye Res. 2021; P.207.

НАНОСТРУКТУРНЫЕ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ СПЛАВЫ НА ОСНОВЕ МАГНИЯ И ЦИНКА ДЛЯ ВРЕМЕННЫХ ИМПЛАНТАТОВ

О.Б. Кулясова^{1,2}, Г.С. Дьяконов², Р.З. Валиев^{1,2}

¹ Уфимский государственный авиационный технический университет, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

e-mail: elokbox@mail.ru

Ключевые слова: УМЗ структура, магниевый сплав, цинковый сплав, биорезорбируемые сплавы, прочность, коррозионная стойкость, интенсивная пластическая деформация/

Магний и цинк характеризуются высоким уровнем физиологической совместимости и входят в состав перспективных сплавов, предназначенных для современных биоразлагаемых имплантатов [1]. Биоразлагаемые имплантаты становятся все более востребованы, поскольку их использование не требует повторной операции по удалению самого имплантата. Особенно актуально использование биоразлагаемых имплантатов в педиатрии, когда пациенты находятся в стадии активного роста, а использование постоянных имплантатов может приводить к отклонению развития поврежденных частей и повторному оперативному вмешательству для удаления имплантата.

Магний и цинк — незаменимые элементы в организме человека. Однако по прочности и пластичности они

не отвечают требуемым свойствам, необходимым для применения в качестве имплантатов. Повышение прочности возможно несколькими способами. Одним подходом является легирование чистого металла другими элементами. Однако большое количество упрочняющих добавок, как правило, резко снижает коррозионную стойкость сплава за счет формирования микрогальванических пар между матрицей зерна и вторыми фазами, что делает сплав непригодным для использования. Следовательно, особой задачей является разработка специальных низколегированных сплавов. Более того, ввиду растворимости сплава в организме человека, существенно сужается выбор легирующих элементов, которые должны быть биологически инертными, либо быть совместимыми с человеческим организмом и не являться токсичными. Другим эффективным подходом повышения прочности считается формирование в сплаве специального структурно-фазового состояния с мелкодисперсной структурой посредством интенсивной пластической деформации (ИПД) [2]. Однако в литературе спорно обсуждается влияние размера зерен на скорость коррозии. Вследствие этого в работе рассматривается взаимосвязь между структурно-фазовым состоянием наноструктурированных сплавов и их механическими и коррозионными свойствами. Было установлено, что ИПД не только ведет к измельчению зерен, но и влияет на морфологию частиц второй фазы, которые, в свою очередь, оказывают значительное влияние на коррозионные свойства. Поэтому для медицинского применения требуется не только выбор состава сплава, но и использование подходов микроструктурного дизайна, позволяющих успешно сочетать повышенные механические и коррозионные свойства, что представляет собой особенно актуальную задачу. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 20-63-47027, а также РФФИ и ГФЕН в рамках научного проекта № 21-53-53021.

Литература:

1. Zheng, Y. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015. 546 p.
2. Valiev R.Z., Islamgaliev R.K., Alexandrov I.V. Progr. Mat. Sci. 2000. V. 45. № 2. P. 103.

СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОГЛАЩАТЬ ИНДУЦИРОВАННЫЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ

С.В. Курбангалеева, М.О. Гомзикова

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: kurbangaleeva_s@mail.ru

Ключевые слова: мононуклеарные клетки периферической крови, микровезикулы, мезенхимные стволовые клетки, цитохалазин В.

Многообещающим терапевтическим средством для регенеративной медицины выступают микровезикулы, которые обладают свойствами продуцирующих их клеток. Для лечения повреждений внутренних органов, микровезикулы инъецируют внутривенно. Однако какой процент микровезикул сливается с клетками крови, не достигнув целевой ткани исследовано недостаточно. В данной работе мы получили биосовместимые микровезикулы с использованием цитохалазина В (МВ-ЦВ), который позволяет увеличить выход микровезикул, делая клетку более пластичной, и исследовали способность различных популяций мононуклеарных клеток периферической

крови (МКПК) человека (моноцитов, NK-клеток, В-клеток, Т-цитотоксических, Т-хелперных лимфоцитов) поглощать индуцированные микровезикулы, происходящие из мезенхимных стволовых клеток *in vitro*.

МКПК выделяли из периферической крови человека методом градиентного центрифугирования в Фиколле. МВ-ЦВ получали из мезенхимных стволовых клеток (МСК) жировой ткани человека путем обработки 10 мкг/мл цитохалазина В в течение 30 мин с последующим центрифугированием: 1) 100 g — 10 мин; 2) 300 g — 20 мин; 3) 2000 g — 25 мин. МВ-ЦВ МСК окрашивали мембранным красителем DiD 5 мкМ в течение 15 мин (37°C, 5% CO₂) и дважды промывали полной средой. МКПК обрабатывали 10 мкг МВ-ЦВ в течение 24 ч и детектировали поглощающую способность с помощью моноклональных антител на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACS Aria III.

Результаты иммуноокрашивания показали, что 99,5 ± 0,26% моноцитов (CD14+ клетки), 69,43 ± 9,52% В-клеток (CD3-CD20+); 35,6 ± 3,83% Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+); 29,6 ± 3,2% NK-клеток (CD3-CD56+) и 14,5 ± 4,42% Т-хелперных лимфоцитов (CD3+CD4+) — содержат DiD в своем составе, а значит слились с МВ-ЦВ МСК. Самый высокий процент слияния/поглощения наблюдали в популяции моноцитов и В-клеток (99% и 69% соответственно). Полученные результаты были подтверждены с помощью конфокальной микроскопии, где мы наблюдали мембранный компонент МВ-ЦВ (DiD+) как на клеточной поверхности, так и внутри МКПК.

Наши данные показывают, что моноциты и В-клетки преимущественно захватывают МВ-ЦВ МСК, в то время как NK-клетки, Т-цитотоксические лимфоциты и Т-хелперы проявляют меньшую способность захватывать индуцированные микровезикулы. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств гранта Российского научного фонда № 21-75-10035.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ HEDGEHOG В ЭПИФИЗАРНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ УВЕЛИЧИВАЕТ РОСТ КОСТИ

А.Д. Куренкова¹, D. Trompet^{2,3}, B. Zhou³, А.П. Усанова¹, Т.Л. Чу³, А. Аре⁴, М. Каспер⁴, А.С. Чагин^{1,2,3}

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

² Институт медицины, Гётеборгский университет, Гётеборг, Швеция

³ Кафедра физиологии и фармакологии, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

⁴ Кафедра клеточной и молекулярной биологии, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

e-mail: n_kurenkova@mail.ru

Ключевые слова: пластинка роста, стволовые клетки, Hedgehog.

Увеличение трубчатых костей в длину происходит благодаря наличию эпифизарных пластинок роста. Недавно в пластинках роста была описана популяция стволовых клеток [1, 2]. Чтобы определить роль этих стволовых клеток в регуляции роста костей, в данной работе мы генетически и фармакологически стимулировали пролиферацию

стволовых клеток через активацию сигнального пути Hedgehog (Hh) и смотрели приводит ли это к изменению длины кости.

Для того, чтобы специфически отметить и отслеживать стволовые клетки пластинки роста, мы использовали линию мышей PthrpCreER, скрещенную с репортерной линией R26R-tdTomato [2]. Десять последовательных в/б инъекций SAG (агонист Hh сигнального пути) 30-дневным мышам приводили к увеличению количества делящихся tdTomato+ клеток через 8 дней: количество клонов, состоящих из двух и трёх клеток увеличивалось на 68,9%, с одновременным падением количества одиночных клеток на 29,6% а количество пролиферирующих Ki67+tdTomato+ стволовых клеток возрастало в 5 раз. Три внутрисуставные инъекции SAG оказывали аналогичный по направлению и силе эффект.

Чтобы проверить, что влияние активации Hh на пролиферативную активность клеток опосредовано прямым воздействием на стволовые клетки, линию PthrpCreER;R26R-tdTomato скрестили с линией Patched1^{fl/fl}. Через 10 дней после активации Cre-рекомбиназы абляция Patched1 приводила к появлению в пластинке больших многоклеточных клонов tdTomato+ клеток, в то время как в контроле было больше одиночных клеток. Таким образом, и фармакологическая, и генетическая активация Hh сигнального пути приводит к увеличению пролиферации стволовых клеток пластинки роста.

Для того, чтобы проверить как фармакологическая активация Hh влияет на рост кости, SAG вводили 30-дневным крысам локально во вторичный центр окостенения над пластинкой роста в бедренной кости, поскольку при внутрисуставной инъекции активация Hh может вызывать остеоартрито-подобные изменения в суставном хряще. Для пролонгации действия и фиксации в кости SAG вводили вместе с агарозными бидсами. Эксперименты с использованием Gli1-LacZ мышей подтвердили, что высвобождение SAG происходит и через неделю после имплантации. Имплантация SAG крысам приводила к увеличению Ki67+ клеток в зоне покоя пластинки роста через 1 неделю, через 1 месяц наблюдали значимое увеличение длины бедренной кости на 3% (1,1 мм), через полгода разница составила 4% (1,4 мм).

Таким образом, мы показали, что активация сигнального пути Hh вызывает увеличение пролиферации стволовых клеток пластинки роста, что в дальнейшем ведёт к увеличению длины конечности. Данный принцип может быть использован для коррекции нарушений роста длинных костей.

Литература:

1. Newton, P. T., Li, L., Zhou, B. et al. Nature. 2019. V. 567(7747). P. 234–238
2. Mizuhashi, K., Ono, W., Matsushita, Y., et al. Nature 2018. V. 563(7730). P. 254–258.

ФОРМИРОВАНИЕ ПАТТЕРНА ИЗ ГИДРОКСИАПАТИТА В МАТРИЦЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

М.А. Кутырев, Е.И. Шишацкая, Е.В. Скорб, С.А. Уласевич

Санкт-Петербургский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kutyrev@infochemistry.ru

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, гидроксиапатит, кольца Лизеганга, биосовместимость.

В области регенеративной медицины бактериальная целлюлоза, благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости и не токсичности, представляет большой интерес в качестве материала для имплантов, повязок для ран и ожогов, так как ее структура способна имитировать ткани организма [1]. Однако адгезия клеток на поверхности бактериальной целлюлозы затруднена, что ограничивает применение этого материала при разработке биомиметических имплантов. В связи с этим для улучшения клеточной адгезии и повышения механической прочности поверхность материала модифицировали фосфатами кальция, которые также влияют на упорядоченность волокон в структуре [2].

Существуют различные подходы по модификации бактериальной целлюлозы гидроксипаттитом (ГА) такие как гидротермальный и золь-гель синтезы. Наиболее перспективным методом является химическое осаждение частиц ГА на поверхности бактериальной целлюлозы при погружении лиофилизированных пленок биополимера в буферный раствор хлорида кальция (рН = 7,2), однако данный способ позволяет сформировать однородное покрытие из конгломератов фосфатов кальция на поверхности матрицы целлюлозы [3] в то время как в некоторых случаях для равномерного восстановления ран необходима различная скорость пролиферации клеток.

В связи с этим целью данной работы является разработка градиентных материалов на основе периодически упорядоченного паттерна ГА и бактериальной целлюлозы.

В данной работе формирование периодических структур ГА получали по аналогии их образования в агаровой матрице [4]. Ксерогель и гидрогель бактериальной целлюлозы предварительно выдерживали в растворе фосфатного буфера (рН = 7,4) для насыщения матрицы биополимера фосфат-ионами, затем на поверхность целлюлозной матрицы капали раствор хлорида кальция, который при его диффузии внутрь 3D-структуры целлюлозного материала формировал периодически упорядоченные осадки в виде колец Лизеганга. Периодически упорядоченные осадки прокрашивали ализариновым красным для визуализации диффузии ионов кальция внутрь гидрогеля. Фосфаты кальция детектировались рентгенофазовым анализом. Биосовместимость полученных структур исследовали с помощью клеточной линии C2C12 и клеток HeLa. Установлено, что на целлюлозе с 3D-паттернами ГА наблюдалась более высокая пролиферация клеток по сравнению с контрольными образцами.

Таким образом, разработан новый способ модификации бактериальной целлюлозы упорядоченными паттернами ГА, позволяющий формировать участки с повышенной клеточной плотностью.

Литература:

1. Klemm D., Ahrem H., Kramer F. et al. in book: *Bacterial Cellulose: a sophisticated multifunctional material*, 1st ed. CRC Press, 2012. P. 176.
2. Bayir E., Bilgi E. et al. *Cellulose*. 2019. V. 26. P. 9803–9817.
3. Athukorala S.S., Liyanage C.J. et al. *Soft Materials*. 2022. V. 2. P. 183–192.
4. Ulasevich S.A., Eltantawy M.M., Skorb E.V. et al. *Adv. Nano-Biomed Res.* 2021. V. 1. № 5. Art. № 2000048/

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ЦИТОХРОМА С ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КАРДИОЛИПИНОМ: СТРУКТУРА БЕЛКА, ЕГО ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И СВОБОДНО РАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

И.Н. Левченко¹, Г.К. Владимиров², И.В. Володяев³

¹ Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

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

e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

Ключевые слова: цитохром С, кардиолипид, пероксидазная активность, кумарины, триггер апоптоза, перекисное окисление липидов, активированная хемилюминесценция, комплекс цитохрома С.

Цитохром С в клетке, в водной среде или в неполярном окружении может находиться как в свободном состоянии, так и в комплексе с кардиолипином. В последнем случае он частично денатурирован, характеризуется специфической конформацией, обладает пероксидазной активностью и является важным компонентом проапоптотических сигнальных путей [1, 2, 4]. Различия между нативным цитохромом С и комплексом цитохром С–кардиолипид регистрируются по спектрам поглощения и флуоресценции, а также по выраженной пероксидазной активности последнего и хемилюминесценции, сопровождающей запускаемые им свободно-радикальных процессы.

Хемилюминесценция, сопровождающая рекомбинацию липидных радикалов, генерируемых вследствие пероксидазной активности комплекса цитохром С–кардиолипид, активируется природными красителями, такими как кумарины. Ярким примером является сенсбилизатор С–525. Он устойчив к прямому окислению пероксидом водорода, поэтому не влияет на протекание липопероксидазных реакций и является физическим активатором. Использование С–525 и других подобных красителей позволяет с высокой точностью регистрировать кинетику образования липидных радикалов в этой системе и, следовательно, оценивать пероксидазную активность цитохрома С.

Последняя, как известно [4], является необходимым этапом в развитии апоптоза по митохондриальному пути. Помимо исследовательского интереса, этот аспект может представлять особую важность для терапии злокачественных заболеваний за счет направленной стимуляции апоптоза в злокачественных клетках с использованием комплекса цитохром С–кардиолипид [3].

Так как комплекс цитохрома С–кардиолипид отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: (а) имеет флуоресценцию низомолекулярных и триптофановых остатков; (б) утрачивает поглощение в полосе Соре (405–410 нм, которая определяет наличие связи $Fe(heme) \cdot \cdot \cdot S(Met80)$), следовательно, это сказывается на значении квантовых выходов, которые отражают усиление свечения активированной ХЛ, без влияния на кинетику процесса; (в) характеризует пероксидазную активность и, соответственно, катализирует образование липидных радикалов в мембране. Данные липидные радикалы запускают цепной процесс перекисного окисления липидов, который наблюдается по хемилюминесценции,

как нативной, так и активированной. При этом квантовый выход активированной хемилюминесценции, на несколько порядков выше, чем в случае не активированной.

Литература:

1. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. Биологические Мембраны. — 2009. — Т. 26. — № 6. — С. 493–504.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измаилов Д.Ю., Навиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Биохимия. — 2006. — Т. 71. — № 9. — С. 1225–1233
3. Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Vasova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Biochemistry. — 2006. — V. 45. — № 15. — P. 4998–5009.
4. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J. et al. Nature chemical Biology. — 2005. — V.1. — № 1 — P. 223–232.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА НА КРИОГЕННЫЙ РУБЕЦ МИОКАРДА

А.И. Лебедева¹, С.А. Афанасьев², Е.М. Гареев¹, Д.С. Кондратьева², С.А. Муслимов¹, С.В. Попов²

¹ ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Уфа, Россия
² НИИ кардиологии, Томский НИМЦ РАН, Томск, Россия

e-mail: e-mail: JeolO2@mail.ru

Ключевые слова: аллогенный биоматериал, криповреждение, миокард, кардиосклероз, макрофаги, регенерация.

Проблема регенерации поврежденного миокарда является одной из важнейших задач тканевой восстановительной терапии сердца. Наиболее перспективным подходом является использование производных децеллюляризованного внеклеточного матрикса — аллогенного биоматериала (АБ) Целью исследования явилось оценка морфофункциональных свойств сердца в условиях применения АБ.

Хронический инфаркт миокарда моделировали на 80 крысах — самцах с использованием метода криодеструкции. Через 45 суток после воздействия жидким азотом при повторной торакотомии в основной группе в область криогенного некроза миокарда вводили суспензию АБ (3 мг, 60 мкл физ. раствора). В контрольной группе вводили физиологический раствор в аналогичном объеме. После 45 суток после введения АБ животных оценивали на толерантность к физической нагрузке и выводили из эксперимента. Проводили гистологические, иммуногистохимические исследования. Определяли толщину мышечной части стенки поврежденного желудочка сердца, рубца и диаметр реактивной зоны. В результате исследования, толщина мышечной части стенки левого желудочка, в основной группе увеличивалась на 3 порядка ($p < 0,008$), что повышало толерантность к физической нагрузке крыс в 2 раза ($p = 0,03$). Изменения параметров толщины рубца и диаметр поврежденной зоны были статистически не значимы. Аллогенный биоматериал подвергался постепенной резорбции макрофагами и замещался волокнисто-соединительнотканно-мышечным регенератом, представленным васкуляризированной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Меченые сердечным тропонин I⁺ клетки проникали в межволоконные пространства, подвергались гипертрофии. Кардиомиоциты группировались в зоне имплантации АБ как в виде отдельных кластеров, так

и функционального синцития. Масса сердца при этом не менялась в обеих экспериментальных группах.

Так, применение АБ в зоне сформированного криогенного рубца миокарда способствовало трансформации плотной в рыхлую волокнистую соединительную ткань и замещению сердечной мышечной тканью.

IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА НА ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫХ И АСТРОЦИТАРНЫХ КУЛЬТУРАХ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

О.Ю. Лисина¹, И.А. Красильникова², Р.Р. Шарипов¹, М.В. Балясин³, В.Г. Пинелис², З.В. Бакаева², А.М. Сурин^{1,2}

¹ ФГБНУНИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² ФГАУ НИМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

e-mail: anezi@yandex.ru

Ключевые слова: нейрональная сеть, ионный гомеостаз, митохондриальный потенциал, кальций, нейроглиальная культура, астроцит, кортекс, нейрит.

Моделирование in vitro повреждения мозга (царапина) применяется для выяснения молекулярно-клеточных механизмов, происходящих в мозге в ответ на травму. В настоящей работе исследованы: (1) регенерация нейрональной сети в зоне царапины; (2) изменения ионного гомеостаза и функций митохондрий в ответ на царапину монослоев первичных нейроглиальных культур и культур астроцитов из коры головного мозга крысы. Изменения указанных параметров определяли методом флуоресцентной микроскопии, используя специфичные зонды и микроманипулятор для нанесения царапины. В нейроглиальных культурах царапины шириной $\approx 0,1$ и 1 мм наносили спустя 3 и 18 дней после посадки культуры (3 и 18 ДВК). Для количественной оценки регенерации культур подсчитывали среднюю длину нейритов, количество ветвлений и окончаний нейритов на единицу поверхности в зоне повреждения. При травмировании «молодой» культуры (3 ДВК) формирование нейрональной сети начиналось через сутки, достигая наибольшей скорости на 2–3 день после нанесения царапины. Затем развитие нейрональной сети в зоне повреждения замедлялось. Помимо роста нейритов, наблюдалась диффузия в поврежденную зону клеток из неповрежденной части культуры. В «зрелых» культурах (травма на 18 ДВК) нейритов, прорастающих в царапину из неповрежденной зоны, было на $\sim 40\%$ меньше и они имели в 2–3 раза меньший диаметр.

В нейро-глиальной культуре в первые минуты после нанесения царапины происходит скачкообразный рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [$[Ca^{2+}]_i$] и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в нейронах. В $22,3 \pm 5,1\%$ нейронов ($n=264$) развивался вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дизрегуляция, ОКД) и синхронное падение $\Delta\Psi_m$. Около 85% таких нейронов находилось на расстоянии < 100 мкм от границы повреждения. Доля нейронов, развивших ОКД, увеличивалась с увеличением возраста культуры. Удаление Ca^{2+} из буферного раствора подавляло посттравматическое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$, указывая на вход Ca^{2+} из буфера, как на причину роста $[Ca^{2+}]_i$.

В культуре астроцитов механическое повреждение вызывало лишь транзиторное повышение $[Ca^{2+}]_i$ без развития ОКД и изменения $\Delta\Psi_m$. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное травмой культуры астроцитов, распространялось от границы повреждения на расстояние примерно вдвое меньшее, чем в нейро-глиальной культуре. В астроцитах удаление Ca^{2+} из буферного раствора не подавляло посттравматическое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, свидетельствуя о мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо, как о причине роста $[Ca^{2+}]_i$.

Таким образом, исследования на астроцитарных и нейро-глиальных культурах позволяют дифференцировать вклад нейронов и астроцитов в изменения $[Ca^{2+}]_i$, вызванные механической травмой. Уход за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Этического комитета ФГБНУ НИИОПП. Выполнено по Гос. заданию FGFU-2022-0012 и Гранту Минобрнауки РФ 08-07-56/2021/82930.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Ю.Ю. Литвинов, В.П. Панин, В.В. Краснов

ФГБНУ Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

e-mail: zip1@list.ru

Ключевые слова: костные имплантаты, сангвиритрин, стерилизация, озono-кислородная смесь.

В настоящее время, в связи с увеличением количества больных с остеомиелитом и возрастающей резистентностью микроорганизмов к антибиотикам, продолжает оставаться актуальной проблема поиска новых препаратов с антимикробными свойствами и создания на их основе биосовместимых имплантационных материалов для реконструкции дефектов костной ткани. В связи с этим, нами разработаны способы получения новых биосовместимых имплантационных материалов, на основе костного матрикса, импрегнированных раствором сангвиритрина — лекарственного средства растительного происхождения с выраженными антибактериальными и антимикотическими свойствами. Проведены исследования, направленные на адаптацию метода стерилизации озono-кислородной смесью для получения биоимплантатов с сохранением антибактериальных свойств действующих веществ растительного происхождения.

Установлено отсутствие существенного влияния озono-кислородной стерилизации с концентрацией озона 8 мг/л и продолжительностью 15 мин в проточном режиме на антибактериальные и антимикотические свойства исследуемых костных образцов, импрегнированных раствором сангвиритрина. Высвобождаемые после озono-кислородной стерилизации из деминерализованного и деорганизованного костного матрикса алкалоиды сангвиритрина не утрачивают своих антимикробных свойств в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*), а также микромицетов (*Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*).

Предложенный подход к получению и стерилизации биосовместимых имплантационных материалов с антимикробными свойствами может быть использован в дальнейших исследованиях с целью разработки

и совершенствования способов получения новых имплантационных препаратов для репарации минерализованной соединительной ткани в инфицированных ранах.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

А.А. Лобов^{1,2}, Д.С. Семенова¹, И.А. Тараскин³, Д.А. Костина¹, А.А. Ивашкин³, И.А. Хворова¹, К.В. Данько⁴, Б.Р. Зайнуллина⁴, В.В. Карелкин⁵, Л.Г. Данилов⁴, В.Е. Успенский², А.Б. Малашичева¹

¹ *Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

⁴ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

⁵ *РНИИТО им. Вредена, Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: lobov@incras.ru

Ключевые слова: кальцинирующий аортальный стеноз, интерстициальные клетки аортального клапана, остеогенная дифференцировка, протеомика, биоинформатика.

Кальцинирующий аортальный стеноз (КАС) — это наиболее распространенный приобретенный порог сердца. На поздних стадиях КАС наблюдается обширная кальцификация клапана, приводящая к потенциально летальным нарушениям кровотока. Не существует подходов для терапии КАС и замена поврежденного клапана — единственный метод, доступный для лечения пациентов с этим заболеванием. Основной вклад в развитие КАС вносит остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток аортального клапана (ИКК). Подавление кальцификации ИКК — это перспективная, но все еще недостаточно изученная терапевтическая мишень.

Мы провели серию исследований по изучению молекулярных механизмов остеогенной дифференцировки ИКК. На первом этапе мы сравнили протеомные и транскриптомные профили ИКК в ходе остеогенной дифференцировки. В работе использовали первичные культуры клеток из клапанов здоровых доноров и пациентов с КАС. Протеомный анализ проводили с двумя группами образцов и, для поиска оптимального метода статистического анализа, мы также провели сравнение различных методов для удаления группового эффекта.

Сравнение ИКК от больных и здоровых доноров не позволило выявить достоверных различий — ИКК в здоровом и кальцинированном клапане принципиально схожи. Это подтверждает, что в развитии КАС принимают участие преимущественно резидентные ИКК. Единственным обнаруженным белком, различающимся между больными и здоровыми клетками, был PRMT5. Этот белок связан с эпигенетической регуляцией и, возможно, развитие КАС ассоциировано с эпигенетическими изменениями ИКК.

Мы подробно описали молекулярные механизмы остеогенной дифференцировки ИКК *in vitro* и нашли несколько перспективных мишеней. Примечательно, что механизмы дифференцировки ИКК значительно отличались от описанных ранее для мезенхимных стволовых клеток. Чтобы подтвердить это, мы провели протеотранскриптомный анализ ИКК и первичных культур

остеобластов человека в ходе остеогенной дифференцировки *in vitro*.

Протеомный анализ проводили при помощи тандемной масс-спектрометрии с ионной подвижностью. В литературе все еще нет примеров сравнения разных подходов протеомики-дробовика, которые можно реализовать на этой платформе, поэтому в рамках поставленной биологической задачи мы провели сравнение *data dependent* (DDA) и *data independent acquisition* (DIA) подходов протеомного анализа.

Методы DIA-протеомики оказались на порядок более эффективными по сравнению с классическим DDA-подходом. Однако все подходы позволили выделить три четких кластера — ИКК в контроле, ИКК в дифференцировке и остеобласты.

Патологическая остеогенная дифференцировка ИКК значительно отличается от нормальной остеогенной дифференцировки при формировании костной ткани. Описанные нами различия представляются перспективными для поиска подходов для терапии КАС. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ номер 18-14-00152.

ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ РАН В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ СУПЕРНАТАНТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

П.Б. Лозовая, Е.Д. Полянских, Е.Г. Костоломова

ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень, Россия

e-mail: p.lozovaya@yandex.ru

Ключевые слова: ранозаживляющее средство «Cellgel», репаративная регенерация, апоптоз.

На 20 половозрелых кроликах — самцах проведен эксперимент, целью которого является изучение методом иммуногистохимии индекса пролиферации (Ki-67-позитивные клетки) и готовности к апоптозу (CD95-позитивные клетки) клеток эпидермиса и дермы в условиях применения супернатанта пробиотических бактерий *Bifidobacterium bifidum*. Понимание роли апоптоза в образовании рубцовой ткани может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток.

Животные были разделены на контрольную и экспериментальную группы. Под общим обезболиванием на спине животного по паравертебральной линии формировали инфицированные раны мягких тканей, через 3–5 суток начинали лечение. В группе контроля лечение проводили традиционным методом. В экспериментальной группе применяли супернатант *Bifidobacterium bifidum*. С 1 по 25 сутки под местной анестезией выполняли биопсию раны. Иммуногистохимические реакции проводили в парафиновых срезах с использованием первичных антител Ki 67, CD95 / Apo 1, (DAKO) и системы визуализации Ep vision. Ядра докрасивали гематоксилином. У контрольной группы закрытие раневого дефекта происходило к 20 суткам с формированием грубого соединительнотканного рубца и сохранением дистрофически — дегенеративных изменений подкожной клетчатки и мышц, дегенеративных изменений нервных стволиков. В экспериментальной группе на 10 сутки эксперимента наблюдается полная эпителизация раневого дефекта с его оволосением, гистологическая картина

эпителизации с сохранением всех функционирующих структур, что характеризует потенцирование супернатантом *Bifidobacterium bifidum* механизмов физиологической репаративной регенерации. При иммуногистохимическом исследовании до начала лечения количество клеток экспрессирующих маркер CD95+ и Ki67+ одинаково во всех группах. В экспериментальной группе на 1–3 сутки наблюдается рост носителей CD95+ с последующим его снижением, начиная с 3–5 суток. С 1 суток, наблюдается рост носителей маркера Ki67+ и продолжается до 15 суток. На 3–5 сутки наблюдаем «перекрест маркеров», что, на наш взгляд, характеризует переход первой фазы раневого процесса во вторую. В группе контроля наблюдается снижение CD95+. На 5 сутки наблюдается некоторый всплеск уровня Ki67+ с дальнейшим его уменьшением практически до нуля. В эпидермисе молодых рубцов обнаруживаются активные процессы пролиферации. Метка локализуется в ядрах клеток базального и шиповатого слоя и округлых клетках, которые имеются в сосудах и между коллагеновыми волокнами зоны роста. В контрольной группы закрытие раневого дефекта происходит к 20 суткам, в дерме метки нет.

Супернатант пробиотических бактерий *Bifidobacterium bifidum* является индуктором апоптоза в первую фазу раневого процесса. Во вторую и третью фазы данное вещество индуцирует механизмы физиологической репаративной регенерации.

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ОСТЕОИНДУКЦИИ НА ОСНОВЕ АЦЕТАТ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С PEEDOT:PSS

К.И. Луканина, Н.А. Шарикова, П.М. Готовцев, Т.Е. Григорьев

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: Lukanina.k@gmail.com

Ключевые слова: тканевая инженерия, аналог ЭЦМ на основе природных полимеров, электропроводящие материалы, PEEDOT:PSS, ацетат целлюлозы.

Как известно для эффективной пролиферации и адгезии остеобластов предпочтительнее использовать нетканый высокопористый материал, обладающий свойством электропроводности [1]. Архитектура полимерной основы может варьироваться в зависимости от типа и локализации замещаемой нативной ткани. В данной работе в качестве полимерной основы выбран диацетат целлюлозы, природный полимер, обладающий требуемыми прочностными характеристиками и биосовместимостью. В качестве электропроводящего наполнителя выбран PEEDOT:PSS, представляющий собой полимерную смесь двух иономеров. Один компонент в этой смеси состоит из полистиролсульфоната натрия, который представляет собой сульфированный полистирол. Часть сульфонильных групп депротонирована и несет отрицательный заряд. Другой компонент — PEDOT, несет положительные заряды и основан на политиофене. Получение материалов на основе полистиролсульфоната ограничено избирательной растворимостью в органических растворителях и технологическими ограничениями в переработке данного полимера. Отдельной задачей является сшивка PEEDOT:PSS, так полимер достаточно быстро растворяется в водных растворах. Однако в работе предложен метод введения данного электропроводящего компонента в полимерную базу.

В качестве архитектуры тканеинженерного каркаса выбран высокопористый губчатый матрикс на основе ацетата целлюлозы, полученный методом лиофилизации. В качестве растворителя использован диоксан. Введение электропроводящей компоненты осуществлено повторной лиофилизацией полимерной основы после импрегнации филлера в водном растворе PEEDOT:PSS. Полученные полимерные материалы подвергнуты модификации в парах сшивателя.

Разработанные материалы охарактеризованы методами электронной микроскопии с контролем процесса деформации и БЭТ; исследованы физико-механические и электропроводящие характеристики. Установлено, что прочность и электропроводность материалов соответствует диапазону значений, требуемых для эффективной пролиферации клеточных структур. Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ № 21-13-00321.

Литература:

1. Shaabani A., Sedghi R. *Polymer*. 2021. V. 223. P. 123694.

МАСШТАБНАЯ ЭКСПАНСИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОЙ ПОПУЛЯЦИИ NK-КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**М.И. Лукашина, П.Н. Вихрева, М.Д. Моллаев,
А.В. Посвятенко, А.В. Кибардин,
М.А. Масчан, С.С. Ларин**

*ФГБУ НИМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия.*

e-mail: mlukashina@mail.ru

Ключевые слова: NK-клетки, получение, культивирование, функциональная активность.

Иммунотерапия, наряду с хирургией, химио- и радиотерапией, подтвердила свою эффективность в лечении злокачественных опухолей. Иммунотерапия использует различные средства, прямого и опосредованного действия, для стимуляции иммунного ответа против патологических клеток. Одним из направлений иммунотерапии является адаптивный перенос иммунокомпетентных клеток в организм пациента. Для этой цели чаще всего используют T- и NK-клетки. У NK-клеток имеется ряд преимуществ, важнейшим из которых является отсутствие необходимости предварительной стимуляции для элиминации клеток-мишеней. Иммунотерапия NK-клетками предполагает введение пациенту значительных количеств клеток. До недавнего времени это было ключевым ограничением. Сейчас для получения необходимого количества клеток используют два основных подхода: с использованием и без использования фидерных клеток.

Источниками для масштабного производства NK-клеток являются: периферическая кровь, пуповинная кровь, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и клеточные линии. Самый распространенный источник для культивирования NK-клеток — это периферическая кровь, которую использовали для дальнейшей работы. Выделение мононуклеарной фракции клеток проводили в градиенте плотности фиколла, а также применяли магнитную сепарацию. Полученную клеточную фракцию культивировали в присутствии фидерной линии K562-mIL15-mIL21-4-1BBL в течении 3 недель. В результате культивирования были получены значительные

количества NK-клеток: увеличение от исходного количества от 50000 до 100000 раз, содержание NK-клеток в конечной популяции составляло от 80 до 98%.

Оценку функциональной активности полученных клеток проводили в прямом цитотоксическом тесте с флуоресцентной визуализацией против опухолевых клеточных линий: K562, меланомы, нейробластомы. В цитотоксическом тесте наблюдали 100% гибель мишеней через 48–72 часа кокультивирования. Кроме того, с помощью проточного цитометрического анализа проводили оценку маркера дегрануляции (CD107a) против клеточной линии K562. При кокультивировании NK-клеток и клеток K562, маркер дегрануляции увеличивался в среднем в 4 раза по сравнению с интактными клетками.

Для оценки возможности хранения полученных функциональных NK-клеток, их криоконсервировали. Функциональную активность, после размораживания, проверяли в тестах аналогичных свежеприготовленным клеткам. Все характеристики сохранялись.

Таким образом разработан и апробирован протокол экспансии и масштабной наработки NK-клеток, пригодных для клинического применения.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ МИКРОРНК ДЛЯ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ С ДОМИНАНТНО-НЕГАТИВНЫМ ВАРИАНТОМ C.607 G>A

**Е.А. Лунев^{1,2,3}, Н.В. Клементьева^{1,2},
И.М. Савченко², А.А. Карань², М.А. Дженкова^{1,2},
Т.В. Егорова^{1,2}, М.В. Бардина^{1,2,3}**

¹ *Лаборатория моделирования и терапии наследственных заболеваний, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

² *ООО «Марлин Биотех», Сочи, Россия*

³ *Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

e-mail: e.lunev.marlin@gmail.com

Ключевые слова: орфанные заболевания, GNAO1-энцефалопатия, генная терапия, доминантно-негативные мутации, микроРНК.

GNAO1-энцефалопатия — орфанное неврологическое заболевание, вызванное мутациями в гене *GNAO1*. *GNAO1* кодирует альфа-субъединицу G-белка ($G\alpha_o$), важную для функционирования центральной нервной системы. Заболевание проявляется у детей младенческого возраста в виде эпилепсии и/или двигательной дисфункции с задержкой развития. Фенотипическая гетерогенность указывает на необходимость применения подходов персонализированной медицины. Один из наиболее частых и тяжело протекающих вариантов GNAO1-энцефалопатии вызван мутацией *GNAO1* с.607 G>A (G2O3R). Предполагательно, мутация имеет доминантно-негативное проявление, хотя механизм нарушения функции белка $G\alpha_o$ в нейронах мало изучен. В настоящей работе мы уточнили фенотипический эффект мутантного белка $G\alpha_o$ -G2O3R в клеточной культуре и разработали подход персонализированной генной терапии в отношении данного патогенного варианта. Для этого в первичную культуру нейронов мыши доставляли с помощью аденоассоциированных вирусов (AAV) бисистронные векторы, экспрессирующие $G\alpha_o$ с мутацией или дикого типа и репортерный белок. Мы обнаружили, что $G\alpha_o$ -G2O3R приводит к повышению общего уровня

внутриклеточного цАМФ — одного из важнейших сигнальных мессенджеров нейронов, в то время как оверэкспрессия здоровой формы $G\alpha$ ведет к снижению концентрации цАМФ относительно контроля. Методом визуализации внутриклеточного кальция мы выявили сниженный ответ на стимуляцию баклофеном нейрональной культуры, экспрессирующей мутантный белок. Полученные нами результаты подтверждают гипотезу о доминантно-негативном проявлении мутации с.607 G>A. Исходя из токсичного проявления $G\alpha$ -G203R в нейронах, ранее нами был предложен генотерапевтический подход, направленный на аллель-селективное подавление транскрипта GNAO1 с.607 G>A с помощью РНК-интерференции. По результатам скрининга были выбраны перспективные эфффекторы РНК-интерференции, демонстрирующие высокую аллель-специфичность и эффективность супрессии в отношении мутантной мРНК. Последовательности эфффекторов использовались для создания искусственных микроРНК в составе экспрессионных ААВ-векторов. Преимущество микроРНК заключается в возможности тканеспецифической экспрессии и сниженных побочных эфффектах в организме. Результаты Вестерн-блота и аллель-специфической кПЦР показали, что доставка кандидатных ААВ-микроРНК в клетки снижает экспрессию мутантного белка $G\alpha$ -G203R, сохраняя продукцию $G\alpha$ дикого типа на высоком уровне. Таким образом, генная терапия с использованием микроРНК является перспективным подходом для GNAO1-энцефалопатии с вариантом с.607 G>A, который характеризуется доминантно-негативным проявлением.

CD133 КАК МАРКЕР РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ

А.Ю. Лупатов¹, А.М. Гисина¹, Я.С. Ким¹,
С.Е. Новикова¹, Д.М. Поташникова²,
Л.К. Курбатов¹, И.В. Холоденко¹,
А.В. Творогова², К.Н. Ярыгин¹

¹ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия.

e-mail: alupatov@mail.ru

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, колоректальная аденокарцинома, CD133, SEACAM5, TRIM28, протеомное профилирование, транскриптомный анализ, CRISPR-Cas9 нокаут.

Раковые стволовые клетки (РС) представляют собой наиболее злокачественную субпопуляцию опухолевых клеток, ответственную за метастазирование и рецидивы заболевания. В случае колоректального рака широко используемым маркером этой субпопуляции является CD133 (проминин-1). С целью выявления новых биомаркеров, ассоциированных с экспрессией CD133, мы провели сравнительное протеомное профилирование CD133⁺ и CD133⁻ субпопуляций, выделенных с помощью FACS из опухолевого материала 5 пациентов. В результате LC-MS/MS анализа было идентифицировано 29 белков с повышенной не менее чем в 2,5 раза экспрессией в CD133⁺ клетках. Среди них SEACAM5 имел повышенную экспрессию во всех CD133⁺ образцах. Дополнительное исследование методом проточной

цитометрии опухолевых клеток от 22 пациентов показало четкую ассоциацию между CD133 и SEACAM5, экспрессия которого, была увеличена в 2–20 раз в субпопуляции РСК у всех пациентов. Чтобы выяснить является ли CD133 регулятором экспрессии SEACAM5 мы получили клоны линий колоректального рака Saso-2 and HT-29, нокаутированные по CD133. Однако нокаут этого гена не менял средний уровень экспрессии SEACAM5 хотя и достоверно увеличивал вариативность его присутствия на мембране клеток. Полученные результаты показывают, что CD133 вряд ли непосредственно регулирует экспрессию SEACAM5, но, возможно, оказывает влияние на его мембранное расположение.

С целью выявления молекулярных регуляторов экспрессии CD133 был проведен сравнительный протеомный и транскриптомный анализ CD133⁺ и CD133⁻ клеток Saso-2, HT-29, а также гепатоцеллюлярной карциномы HUH7. Число дифференциально экспрессирующихся белков (отличающихся минимум в 2 раза) было 35 для HT-29, 39 для Saso-2; и 75 для HUH7. Транскриптомный анализ выявил 10 дифференциальных транскриптов для линии HT-29, 71 для линии Saso-2, 66 для линии HUH7. CD133 был единственным транскриптом, дифференциально экспрессирующимся во всех 3 линиях. Полученные данные были объединены и проанализированы с использованием платформы «GeneXplain» для поиска молекулярных ключевых регуляторов CD133. В результате *in silico* анализа был сформирован список из 16 потенциальных ключевых регуляторов (транскрипционных факторов), предположительно участвующих в регуляции экспрессии CD133, среди которых, TRIM28 получил максимальный рейтинг. Нокаут *TRIM28* методом геномного редактирования с использованием CRISPR-Cas9 практически полностью подавлял экспрессию CD133 в клетках Saso-2. Таким образом, подтверждена роль TRIM28 в качестве молекулярного регулятора экспрессии CD133. Эта молекула может стать потенциальной мишенью для терапии опухолей, направленной против РСК. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

ЭРИТРОПОЭТИН КАК АКТИВАТОР АУТОФАГИИ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

А.П. Лыков^{1,2}, М.А. Суровцева¹, Н.А. Бондаренко¹,
И.И. Ким¹, Ю.С. Гаврилова¹, О.В. Повещенко¹

¹ НИИКЭП-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск,
Россия

² ФГБУ НИИТ Минздрава России, Новосибирск,
Россия

e-mail: aplykov2@mail.ru

Ключевые слова: эритропоэтин, мезенхимные стволовые клетки, аутофагия.

Тканеспецифические стволовые клетки взрослого организма, включая мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), вовлечены в процесс регенерации поврежденных органов и тканей. МСК рассматриваются как альтернативный способ лечения при различных дегенеративных процессах в органах и тканях [1]. К недостаткам лечения дегенеративных процессов с использованием МСК можно отнести кратковременность терапевтического потенциала стволовых клеток, как следствие гибели в условиях неблагоприятного микроокружения [2].

Эритропоэтин (ЭПО) способен усиливать терапевтический потенциал МСК [3]. Однако механизмы, ведущие к увеличению терапевтического потенциала МСК, предобработанных ЭПО исследованы недостаточно. Целью работы — оценка влияния ЭПО на аутофагию в МСК.

МСК получены из костного мозга больных ишемической болезнью сердца. Принадлежность к «истинным» МСК верифицирована фенотипированием, дифференцировкой в соединительнотканном направлении. МСК 4-го пассажа культивировали в питательной среде ДМЕМ, с добавлением 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфера, 10% ЭТС, антибиотика и 33,4 МЕ/мл ЭПО (Рекормон, Швейцария) до 3-го пассажа. Аутофагию оценивали иммуноцитохимическим способом с использованием моноклональных антител к LC3B (Abcam, США) и DAPI (BD, США), флуоресценцию анализировали на микроскопе Axio Observer Z1.

Показано, что культивирование МСК с ЭПО способствует увеличению аутофагии в 2,7 раза по сравнению с контролем на том же сроке культивирования.

Таким образом, одним из механизмов усиления терапевтического потенциала МСК ЭПО является активация аутофагии, что наделяет клетки способностью противостоять неблагоприятным факторам микроокружения.

Литература:

1. Александрович Н.А., Данилова Н.В., Григорьева О.А. и др. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. № 1. С. 42–47.
2. Lu D., Jiang Y., Deng W. et al. Cell Transplant. 2019. V. 28. N 4. P. 645–652.
3. Lin H., Ling Y., Pan J, Gong H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 517. N 4. P. 575–580.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

А.П. Лыков^{1,2}, М.А. Суровцева¹, Н.А. Бондаренко¹, И.И. Ким¹, Ю.С. Гаврилова¹, Н.П. Бгатова¹, О.В. Повещенко¹

¹ НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБУ НИИТ Минздрава России, Новосибирск, Россия

e-mail: aplykov2@mail.ru

Ключевые слова: эритропоэтин, мезенхимные стволовые клетки, фенотип, клеточный цикл, пролиферация, миграция.

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) способны стимулировать репаративные/регенеративные процессы, как в норме, так и при патологических процессах. Терапевтический потенциал МСК в отдельности и при сочетании их с другими биологически активными молекулами, в том числе и эритропоэтин (ЭПО), показан как на экспериментальных моделях у животных, так и в клинических исследованиях на человеке [1–3]. Однако возраст, хронические воспалительные процессы в организме существенно влияют на функциональные свойства клеток, что диктует необходимость «лечения» стволовых клеток перед их использованием как терапевтического агента. ЭПО проявляет цитопротективное действие на различные клетки организма. Цель исследования — оценка влияния различных сроков экспозиции МСК с ЭПО in vitro на функциональный потенциал клеток.

МСК выделены из костного мозга больных ишемической болезнью сердца. МСК 4-го пассажа инкубировали с ЭПО (33,4 МЕ/мл, Рекормон, Швейцария) в течение 1, 72 часов, 1 и 4 недель. Оценивали экспрессию молекул адгезии, рецепторов к ЭПО (ЭПОР), ко-экспрессию ЭПОР с общей бета-цепью цитокинов, апоптоз/некроз, клеточный цикл, пролиферацию, миграцию.

Характер изменения экспрессии молекул адгезии на клеточной мембране МСК зависел от времени экспозиции с ЭПО и количества пассажей. Кратковременная экспозиция МСК с ЭПО (1 или 72 часа) существенно не влияла на пролиферацию клеток. При длительном культивировании МСК с ЭПО отмечено снижение апоптоза/некроза, уменьшения доли клеток в G₀G₁ фазе клеточного цикла, увеличению пролиферативного и миграционного потенциала и продукции ЭПО. Предобработка МСК ЭПО способствовала возрастанию устойчивости клеток к окислительному стрессу, гипергликемии и их сочетанию. По данным электронной микроскопии предобработка МСК ЭПО способствовала увеличению объемной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума на 47%.

Таким образом, предобработка МСК эритропоэтином стимулирует изменения функциональной активности клеток.

Литература:

1. Borow K.M., Yaroshinsky A., Greenberg B., Perin E.C. Cir. Res. 2019. V. 125. N 3. P. 265–281.
2. Kot M., Musial-Wysocka A., Lasota M. et al. Acta Biochim. Pol. 2019. V. 66. N 4. P. 499–507.
3. Li J.P., Wang D.W., Song Q.H. Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. N 4. P. 19005–19015.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

И.В. Лядова¹, Т.А. Ненашева¹, О.Н. Шевелева¹, Е.В. Григорьева², С.П. Медведев²

¹ ФГБНУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: ivlyadova@mail.ru

Ключевые слова: Макрофаги, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка клеток, генетическая модификация клеток.

Одним из актуальных направлений регенеративной медицины является регенеративная медицина иммунной системы, направленная на восстановление функционирования иммунных клеток. Среди других клеток иммунной системы, интерес представляют клетки врожденного иммунитета, в частности — макрофаги (МФ). МФ играют важную роль в поддержании гомеостаза организма, в формировании защитного иммунитета, а их дисфункция является существенным фактором патогенеза многих заболеваний, в связи с чем МФ рассматриваются как перспективная мишень и потенциальный источник клеточной терапии. В последние годы большой интерес вызывают МФ (иМФ), дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК). Генерация иМФ из иПСК: а) моделирует дифференцировку тканевых резидентных МФ в эмбриогенезе; б) позволяет получать генетически модифицированные МФ; в) позволяет получать

МФ в масштабируемых количествах. В докладе обсуждаются принципы получения иМФ, наиболее перспективные направления их использования, вопросы безопасности клинического применения, а также суммируются результаты собственных исследований иМФ.

В результате собственных исследований отработана модель и различные протоколы получения иМФ, показано, что иМФ имеют характерную для МФ морфологию и фенотип ($CD14^+CD45^+CD11b^+$), экспрессируют маркеры характерные для «наивных» неполяризованных МФ (фенотип $CD163^{+/low}CD206^{+/low}HLA-DR^{+/low}CD86^{+/low}CD80^{low}$), ко-продуцируют про- и противо-воспалительные цитокины/хемокины (IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL8, CXCL10, IL-10, IL-1RA, CCL22 и др.), отвечают на воспалительные сигналы (LPS/IFN- γ), обладают высокой фагоцитарной активностью, способны эффективно подавлять бактериальную инфекцию в модели *in vitro*. Сравнительный анализ иМФ, полученных с использованием различных протоколов, показал, что все иМФ имеют сходные морфологические и фенотипические характеристики, однако различаются по деталям транскриптомного профиля (экспрессии генов, ассоциированных с воспалительным ответом, липидным обменом, презентацией антигена) и траекториям дифференцировки. С использованием системы CRISPR/Cas9 разработана модель и показана возможность получения генетически модифицированных иМФ человека с индуцибельной экспрессией генов, участвующих в регуляции воспалительного и противоинфекционного иммунитета.

В целом, разработана модель получения иМФ и генетически модифицированных иМФ человека, которая может быть использована для изучения механизмов и разработки методов коррекции воспалительного и противоинфекционного иммунитета, а в перспективе — для коррекции нарушенных функций макрофагов в клинике. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-075-1076. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И АУТОФАГОЦИТАРНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ СТАРЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

А.С. Магнаева¹, Т.И. Баранич^{1,2}, А.А. Гофман²,
Д.Н. Воронков¹, В.С. Сухоруков¹

¹ ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

e-mail: alinamagnaeva03@gmail.com

Ключевые слова: митохондрия, аутофагия, старение головного мозга, нейродегенерация.

За последние десятилетия было показано, что при старении головного мозга поддержание функционального пула нейронов тесно связано с постоянным обновлением цитоплазмы и окислительным фосфорилированием, что определяет актуальность изучения аутофагии и митохондрий для разработки таргетной терапии возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний [1].

Цель исследования — определение уровней экспрессии маркеров шаперон-опосредованной аутофагии HSP70, LAMP2A, макроаутофагии LC3B, V ферментного комплекса митохондрий ATP5A, контроля качества митохондрий DJ1 в нейронах различных зон головного мозга человека при старении.

Аутопсийный материал был получен от 30 умерших старческого возраста, причиной смерти которых

явилась тромбоземболия легочной артерии. Для сравнительного анализа был использован аутопсийный материал лиц 35–45 лет (n=10), умерших от внезапной сердечной смерти. В анамнезе больных отсутствовали указания на когнитивные и двигательные нарушения. Иммуногистохимическое исследование было проведено с использованием антител к LC3B, HSP70, LAMP2, ATP5A и DJ1. Оптическая плотность оценивалась в перикарионе 150 крупных нейронов V слоя коры прецентральной извилины, стриатума, пирамидного слоя гиппокампа. Для выявления различий между группами использовали критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты иммуногистохимического исследования выявили увеличение экспрессии HSP70 в примерно 2 раза, а LAMP2A и LC3B в 1,5 раза в старческой возрастной группе по сравнению с контролем. Экспрессия ATP5A в нейронах коры, стриатума, гиппокампа в группе старческого возраста по сравнению группой молодого возраста была выше на 42%, 26% и 41%, соответственно. Во всех изученных зонах при старении отмечалась тенденция к снижению значений DJ1, однако статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Таким образом можно предположить, что обнаруженные нами изменения уровней маркеров различных типов аутофагии, АТФ-синтазы и маркера качества митохондрий, вероятно, способствуют выживаемости нейронов при возрастной инволюции за счет поддержания протеостаза и адекватного уровня энергии в клетках, а дальнейшее изучение вышеуказанных белков с помощью различных методов клеточной и молекулярной биологии может внести вклад в понимание механизмов старения.

Литература:

1. Mattson M.P., Arumugam T.V. Cell Metab. 2018 Jun 5;27(6):1176–1199.

БЕАНТИТЕЛЬНЫЙ ХИМЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР FLT3-CAR ДЛЯ ТАРГЕТИРОВАНИЯ ТИРОЗИНКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА FLT3 — МАРКЕРА ПЛОХОГО ПРОГНОЗА ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

В.Е. Майорова, М.Д. Моллаев, П.Н. Вихрева,
Е.А. Кулаковская, Д.Е. Першин,
А.В. Кибардин, М.А. Масчан, С.С. Ларин

ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дм. Рогачева МЗ РФ, Москва,
Россия

Ключевые слова: химерные рецепторы CAR, лейкоз, FLT3.

Химерные рецепторы CAR — трансмембранные рецепторы, последовательность которых методами геной инженерии собрана из двух функциональных частей: внеклеточная часть химерного рецептора, узнающая опухолевый антиген на поверхности клетки-мишени, и внутриклеточная часть, состоящая из последовательности активирующего домена Т-клеточного рецептора CD3 ζ , а также одного или нескольких ко-стимулирующих доменов. В результате узнавания внеклеточной частью химерного рецептора CAR опухолевого антигена происходит активация CAR Т-клетки с последующим специфическим элиминированием опухолевой клетки.

Традиционно дизайн внеклеточной части рецептора CAR включает создание генетической конструкции, кодирующей одноцепочечный фрагмент варибельной части (scFv) известного моноклонального антитела против

конкретной молекулярной мишени. Известно, что scFv части отдельных химерных рецепторов CAR часто стремятся к агрегации, в частности посредством «обмена доменами» (domain-swapping). Агрегация химерных рецепторов CAR приводит к тонической активации CAR T-клеток, снижая специфичность цитотоксической активности CAR T-клеток, а также приводя к более быстрому истощению пролиферативного потенциала (снижению персистенции) CAR T-клеток. Тенденция к агрегации является характеристикой каждой конкретной последовательности scFv. Подбор оптимальной последовательности внеклеточной части рецептора CAR является трудоемкой и времязатратной процедурой.

В данной работе в качестве внеклеточной части химерного рецептора использовалась полноразмерная последовательность Flt3-лиганда — естественного агониста тирозиназного рецептора Flt3. Flt3-лиганд с высокой аффинностью взаимодействует с рецептором Flt3. Рецептор Flt3 представлен в повышенном количестве на поверхности бластных клеток в большинстве случаев острого миелоидного лейкоза. В примерно трети случаев рецептор Flt3 несет активирующую мутацию, что связывают с плохим прогнозом. Таким образом, безантительные Flt3-CAR T-клетки могут более специфично элиминировать бластные клетки при остром миелоидном лейкозе.

В ходе работы была получена генетическая конструкция, кодирующая безантительный химерный рецептор Flt3-CAR, содержащая полноразмерную последовательность неизмененного Flt3-лиганда. С помощью лентивирусной трансдукции донорских CD3-позитивных клеток были получены Flt3-CAR T-клетки. Было показано, что Flt3-CAR T-клетки специфически элиминируют Flt3-позитивные клетки ТНР-1 и не мешают пролиферации Flt3-негативным клеткам U937. Используя клетки Flt3-CAR Jurkat как модель Flt3-CAR T-клеток, неспособную к T-клеточной активации, было показано, что химерный белок Flt3-CAR не цитотоксичен по отношению к Flt3-позитивным клеткам ТНР-1. Киллинг Flt3-позитивных клеток ТНР-1 дозозависимо ингибировался растворенным рекомбинантным Flt3-лигандом.

Таким образом, полученные Flt3-CAR T-клетки специфически убивают Flt3-позитивные клетки *in vitro*. Для элиминирования клеток-мишеней безантительным Flt3-CAR T-клеткам необходим функциональный механизм T-клеточной активации. Безантительные Flt3-CAR T-клетки взаимодействуют с клетками-мишенями через сайт связывания Flt3-ligand:Flt3 рецептора Flt3 на поверхности ТНР-1.

БИОСОВМЕСТИМОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ УКРЫТИЯ ДЕФЕКТА ФИБРОЗНОГО КОЛЬЦА В ПОЯСНИЧНОМ ОТДЕЛЕ ПОЗВОНОЧНИКА ПОСЛЕ СЕКВЕСТРЭКТОМИИ

С.А. Макаров¹, А.Г. Аганесов¹, М.М. Алексанян¹, В.А. Демина², О.А. Спирин¹

¹ ФГБНУ Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: makarov.spine@gmail.com

Ключевые слова: грыжа межпозвоночного диска, дискэктомия, секвестрэктомия, дефект фиброзного кольца.

Дегенеративно-дистрофические изменения поясничного отдела позвоночника занимают 5 место среди

причин госпитализации и 3 место среди причин хирургического лечения. В настоящее время золотым стандартом хирургического лечения при грыжах межпозвоночного диска в поясничном отделе позвоночника является микрохирургическая или эндоскопическая секвестр- или дискэктомия. При этом риск развития рецидива заболевания при эндоскопическом методе достигает 30%, а при микрохирургическом — 10%. Рецидивы грыж межпозвоночных дисков часты, так как при классическом исполнении операции остаётся дефект в фиброзном кольце и задней продольной связке. Для снижения риска развития рецидива на мировом рынке в настоящее время существует единственный импортный (США) биосовместимый имплант, который не получил распространения в связи с высокой стоимостью, а также остаточным высоким риском рецидива. На отечественном рынке аналогов не существует. При использовании межтеловых кейджей после дискэктомии с последующей фиксацией позвонков с целью создания спондилодеза после операции возникают следующие осложнения: синдром смежного уровня, миграция фиксаторов, что требует проведения повторных оперативных вмешательств. Кроме того, при проведении таких операций многократно возрастает её продолжительность, объём кровопотери, увеличивается срок пребывания на постельном режиме. При использовании нашего устройства в позвоночно-двигательном сегменте сохраняется полная амплитуда движений, что, в свою очередь, является профилактикой и синдрома смежного уровня.

Нами планируется создание биосовместимого устройства для укрытия дефекта фиброзного кольца для предотвращения рецидивов после поясничной секвестрэктомии. Разработка биосовместимого устройства для укрытия дефекта фиброзного кольца при малоинвазивных операциях на поясничном отделе позвоночника позволит улучшить результаты хирургического лечения дегенеративных заболеваний поясничного отдела позвоночника и улучшить качество жизни данной группы пациентов, которые в основном являются людьми трудоспособного возраста.

В настоящее время разработан эскиз устройства; совместно с НИЦ «Курчатовский институт» проводятся комплексные испытания для изучения свойств материалов для выбора наиболее подходящего.

ВКЛАД РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ В ТЕРАПИЮ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С.В. Макаров¹, Н.Х. Муселимян²

¹ Институт интегративной медицины, Москва, Россия

² The George Washington University, Washington, DC, USA

e-mail: iimmsv@yandex.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, рассеянный склероз, миастения.

Памяти нашего учителя, одного из основоположников регенеративной медицины в Поволжье, профессора СамГМУ М.В. Угловой посвящается

В последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости аутоиммунной патологией во всем мире. Это касается также хронических прогрессирующих аутоиммунных заболеваний нервной системы: рассеянного

склероза (РС), миастении (МА)- приводящих к ранней инвалидизации. По данным различных авторов в настоящее время в мире насчитывается более двух миллионов больных РС. Показатель распространенности миастении достигает 38 на 100 тыс. населения в зависимости от региона. Несмотря на раннюю диагностику аутоиммунных заболеваний нервной системы (АИЗН), успехи фармакотерапии, остаются проблемы, нуждающиеся в других терапевтических стратегиях для контроля активности заболевания (Smith JA., et al. 2021), предотвращения прогрессирования инвалидности, преодоления резистентности к стандартной терапии.

Гемопозитические стволовые клетки (ГСК) используются в терапии РС около 20 лет в протоколах низко, средне и высокодозной иммуносупрессивной терапии (ВИСТ) с последующей аутотрансплантацией стволовых кроветворных клеток (АТСКК). Иммуноабляция позволяет элиминировать аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, нивелировать иное влияние иммунных механизмов при РС. АТСКК приводит к реконституции иммунной системы без иммунопатологических звеньев, формирующих заболевание, где воспалительный и нейродегенеративный процессы соседствуют. Пациенты с РС в целом хорошо переносят АТСКК, риск смертельных осложнений близок к 0,3%. В Европейском регистре по трансплантации костного мозга (ЕВМТ) на 2021 год находится 1875 больных РС после АТСКК с различными типами заболевания [1]. На ранних стадиях заболевания с ремиттирующим течением, где преобладает воспалительный процесс в ЦНС, отмечается высокая эффективность лечения с регрессом неврологических симптомов по шкале EDSS и последующей стабилизацией состояния в течении 3–5 лет по разным данным у 70–90% больных РС. Эти результаты в целом соответствуют нашим наблюдениям 49 пациентов (Макаров С.В. и др. 2016), при этом пятилетняя выживаемость без прогрессирования составила в группе РС, резистентные к стандартной фармакотерапии формы, являются показанием к АТСКК. Было отмечено (Sharrck B. et al., 2020), что АТСКК, по-видимому, дает явное преимущество с точки зрения NEDA (отсутствие признаков активности заболевания), демонстрируя показатели 66–93% по сравнению с отдельными препаратами второй линии терапии — моноклональными антителами.

АТСКК имеет ограниченную эффективность при прогрессирующих формах РС [2], отсутствует влияние на нейродегенеративный процесс (Murago et al., 2017). Предполагалось, что аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) или нейральных стволовых клеток (НСК) может справиться с такой задачей. Обладая нейропротективным и нейротрофическим влиянием, МСК секретируют факторы, индуцирующие рост аксонов и увеличивающие выживаемость клеток *in vitro* (Kim et al., 2010). Так же МСК проявляют иммуносупрессивную активность путем модуляции регуляторной функции Т-клеток. В работе Karussis et al. (2010) у пациентов с ремиттирующим и прогрессирующим РС отмечались иммуномодулирующие эффекты после аутотрансплантации МСК и статистически значимое улучшение показателей EDSS в течение 6 месяцев наблюдения. В то же время в группе с прогрессирующим течением РС во второй фазе исследования по введению МСК не отмечалось стойких улучшений (Bonab et al., 2012). На животных моделях РС было установлено, что трансплантация НСК ингибирует периферическую и периваскулярную активацию провоспалительных Т-клеток и увеличивает количество противовоспалительных Т-reg. (Pluchino et al., 2005). Использование НСК на животных моделях

РС выявило их паракринные функции, ограничивающие развитие нейродегенеративного процесса, что открывает в будущем перспективу применения клеток в клинической практике.

Авторами [3] были проанализированы результаты публикаций в базах данных: PubMed/Medline, EMBASE, Web of Science Cochrane Library до сентября 2021. Описано 10 больных с рефрактерной к стандартному лечению МА, которым была проведена АТСКК. У всех наблюдалось клиническое улучшение и ремиссия заболевания. У нас имеется собственный опыт наблюдения двух пациентов с МА после ВИСТ АТСКК. В первом случае после трансплантации отмечался стойкий регресс большинства признаков заболевания с многолетней ремиссией; второй случай без клинического эффекта указывает на то, что больные с МА с длительными сроками заболевания и сопутствующей патологией в стадии декомпенсации имеют ограничения для проведения такой терапии. Просматриваются перспективы персонализированной терапии МА с использованием гуманизированной доклинической модели предварительно кондиционированных МСК (Sudres M., et al. 2017), что позволяет включать механизмы ингибирования клеточной пролиферации и связанных с В-клетками костимулирующих молекул, а также активировать регулятор комплемента DAF/CD55.

По поводу применения аллогенной трансплантации при АИЗН не существует единого мнения из-за высокого риска посттрансплантационных осложнений. Дальнейшая разработка терапевтических стратегий на основе достижений регенеративной медицины, изучения стволовых клеток может оказать значительное влияние на качество жизни пациентов с АИЗН.

Литература:

1. Alexander T., Greco R. Bone Marrow Transplantation (2022) 57:1055–1062.
2. Makarov S., Nikolaeva A. et al. Journal of the Neurological Sciences (2021) 429: 118195.
3. Jaime-Pérez JC, Meléndez-Flores JD, Ramos-Dávila EM. et al. Cytotherapy (2022), 24: 676–685.

ПОДХОД К ГЕНОТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**О.Г. Макеев^{1,2}, С.В. Костюкова^{1,2},
А.В. Коротков^{1,2}, С.Б. Антонова¹**

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия.

e-mail: larim@mail.ru

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, ген CD 86, экзосомы.

Необходимость поиска новых путей терапии аутоиммунных заболеваний обусловлена ограниченным арсеналом средств с минимальными числом побочными проявлениями.

Известно, что белок CD 86 в физиологической концентрации индуцирует иммунный ответ организма посредством связывания со стимулирующим рецептором CD 28 Th клеток. Также показано, что избыточная концентрация белка CD 86 в результате активации генов,

ответственных за синтез белка CTLA-4, подавляет иммунный ответ [1, 2].

В нашем исследовании получены экзосомы, несущие избыточное количество белка CD-86. Последнее достигалось путем трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пациента вектором на основе плазмиды Plasmid 1764 Addgene, с встроенным геном CD 86. Плазмиды с встроенным геном использовали для получения компетентной культуры *E.coli* (штамм XL1-Blue). Трансфекцию выполняли по достижению 4-го пассажа с ежесуточной заменой 30% культуральной среды. Забранную среду использовали для приготовления экзосом методом магнитосорбции.

Полученные экзосомы в последующем использовали для терапии обострений атопического дерматита у трех пациентов (мужчины в возрасте 24–35 лет) с их информированного согласия путем нанесения на область кожного повреждения дважды в день с интервалом в 12 часов. В отсутствии базисной терапии все пациенты отмечали снижение симптоматики уже в первые три дня применения: исчезновение зуда, шелушения и сухости, а в дальнейшем — нормализацию внешнего вида кожных покровов. Исследование выполняется в ходе реализации с госзадания. Рег. № 121032400217-9.

Литература:

1. Yanlan Huang, Bin Wei, Yingcui Gao et al. *Cent Eur J Immunol*. 2020; 44(4): 364–369. 2020 Jan 20.
2. Miaomiao Han, Jingyu Ma, Suidong Ouyang, et al. *Cell Mol Immunol*. 2022 Jul; 19(7): 805–819. 2022 May 12.

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *KLOTNO* СОПРОВОЖДАЕТСЯ СНИЖЕНИЕМ ПРОЯВЛЕНИЙ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

О.Г. Макеев^{1,2}, Е.А. Шуман^{1,2}, А.В. Коротков^{1,2}, М.А. Десятова^{1,2}, М.А. Уфимцева¹

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

e-mail: larim@mail.ru

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, атопический дерматит, ген *Klotho*.

Одним из наиболее перспективных направлений терапии атопического дерматита считается применение тканеинженерных конструкций на основе клеток. Однако, эффективность такой терапии как правило не превышает 40% [1]. Целью исследования явилось повышение успешности лечения повреждений кожи, что достигается путем использования не клеток, а секретируемых ими экзосом, содержащих потенциальные терапевтические агенты.

Так, с целью повышения терапевтического потенциала мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани в процессе культивирования трансфецировали плазмидными векторами, обеспечивающими эктопическую экспрессию гена *Klotho* (membrane, Addgene plasmid 17712) и повышающего клеточную резистентность [2]. Спустя четыре пассажа, забирали «кондиционную» среду (не более 30% от общего объема с заменой на свежую культуральную среду). С целью получения экзосом, отобранную среду центрифугировали. Полученный супернатант фильтровали

на фильтрах с диаметром пор 100 нм и выделенные экзосомы анализировали на содержание белка *Klotho* и резистентность к долговременному хранению в условиях гипотермии. Оказалось, что концентрация белка *Klotho* составила 456–486 пг/мл и не изменялась во время хранения (36 суток). В последующем экзосомы наносили непосредственно на поврежденные участки кожи четырех пациентов. Предварительные данные об эффективности метода у данных пациентов — добровольцев с их информированного согласия позволяют предполагать перспективность данного подхода. Исследование выполняется в рамках госзадания № 121032400217-9.

Литература:

1. Husing B., Buhrlen B., Gaisser S.H. Fraunhofer Institut for Systems and Innovation Research, Karlsruhe, Germany, 2003, P60.
2. Xiao, J., Zheng, S., Qiu, Z., & Wu, K. *Asian journal of urology*, 2022. 9(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2021.04.009>

О ПРИРОДЕ РАКА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

А.В. Макрушин

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742, пос. Борок Ярославской обл, Россия

e-mail: makru@ibiw.ru

Ключевые слова: междисциплинарный подход, эволюционная медицина, бесполое размножение.

Большинство онкологов считает, что злокачественная опухоль возникает в результате размножения одной единственной мутировавшей клетки. Есть другое объяснение природы онкогенеза. Согласно ему рак — это атавизм, результат пробуждения древнего спавшего механизма бесполого размножения, то есть механизма нормально-онтогенеза очень далеких предков [1]. Бесполое размножение — это образование новой особи, но не из зиготы, а из комплекса соматических клеток [2]. Бесполое размножаются наиболее примитивные первичноводные беспозвоночные, находящиеся близко к основанию филогенетического дерева Metazoa. Большинство Metazoa способность к бесполому размножению утрачена. Но их регуляторная физиологическая система механизм этого процесса в неактивном спящем виде хранит. Заболевание раком, согласно альтернативному объяснению природы этой болезни, происходит из-за того, что этот механизм пробуждается и начинает работать. Чтобы предупредить возникновение злокачественной опухоли, следует не допускать пробуждения этого механизма.

Но как это делать? Если исходить из альтернативного объяснения природы онкогенеза, то ответ на этот вопрос есть. Онкогенез, согласно альтернативному объяснению природы рака — это атавистическое бесполое размножение. Значит, опухоль — это атавистический зародыш новой особи. Для предотвращения образования нормально-онтогенеза, то есть возникающего из зиготы зародыша, женщины используют противозачаточные средства. Поэтому для предотвращения образования опухоли нужно применять тоже их. Понятно, что эти противозачаточные средства должны быть совершенно другого состава, чем противозачаточные средства, предотвращающие беременность, так как механизмы полового и бесполого размножения сильно различаются.

Эффективность противозачаточных средств, предотвращающих беременность, основана на знании

механизма регуляции полового размножения. Механизм же регуляции бесполого размножения животных неизвестен. Его не изучали. Не изучали его потому, что губки, стрекающие, колониальные асцидии и другие размножающиеся бесполо примитивные беспозвоночные не представляют значительного практического интереса. Незнание механизма регуляции бесполого размножения не дает возможности что-либо сказать о том, как регулируется образование опухоли, а значит и о том, как воздействовать на ее образование, то есть как не допускать пробуждения спящего механизма бесполого размножения. Чтобы найти средство, предотвращающее рак, нужно прежде понять, как регулируется бесполое размножение у беспозвоночных.

Но накоплены обширные сведения о регуляции бесполого размножения у растений. Очень вероятно, что механизм регуляции бесполого размножения у них схож с механизмом регуляции бесполого размножения у животных. Поэтому для понимания механизма регуляции бесполого размножения животных (и для понимания механизма возникновения опухоли) важно знать результаты исследований бесполого размножения растений.

Литература:

1. Макрушин А.В. Как и почему возник механизм старения и онкогенеза: гипотеза. Ж. общ. биологии. 2008. Т. 69. № 1. С. 19–24.
2. Иванова-Казас О.М. Бесполое размножение животных. 1977. Л. Изд. ЛГУ. 239 с.

РЕПАРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ M2 МАКРОФАГОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЭФФЕРОЦИТОЗА

**А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно,
А.А. Останин, Е.Р. Черных**

*НИИ фундаментальной и клинической иммунологии,
Новосибирск, Россия*

e-mail: parkinson.dses@gmail.com

Ключевые слова: макрофаги, эффероцитоз, фибробласты, клеточная терапия, заживление ран.

Длительно незаживающие раны и нарушение регенерации являются актуальной медицинской проблемой. Одно из перспективных направлений терапии в настоящий момент связано с использованием макрофагов [1]. Данные клетки представляют собой гетерогенную пластичную популяцию, внутри которой выделяют фенотипы M1 (провоспалительный) и M2 (противовоспалительный). При этом макрофаги могут быть поляризованы в M2 направлении различными стимулами [2]. Показано, что M2 макрофаги способны оказывать положительное воздействие на заживление ран [3].

Нами был разработан протокол получения макрофагов с M2 фенотипом, в котором ключевым механизмом поляризации является распознавание и поглощение моноцитами апоптотических клеток неадгезивной фракции [4]; клетки были обозначены как M2(LS, Low Serum). Репаративный потенциал данных клеток оценивали по способности модулировать функциональную активность фибробластов дермы (пролиферацию, экспрессию α -SMA, продукцию коллагена I типа) в сравнении с M1 и M2. Содержание растворимых факторов (ангиогенин, TGF- β , VEGF) определяли при помощи иммуноферментного анализа.

По сравнению с M1, M2(LS) характеризовались более выраженным стимулирующим

влиянием на пролиферацию (увеличение в 3,55 раза vs 2,4) и дифференцировку фибробластов дермы (α -SMA-экспрессирующих клеток в культуре 69,5% vs 48%; содержание коллагена 107,3 нг/мл vs 77,3 нг/мл). Более того, M2(LS) активнее стимулировали дифференцировку фибробластов по сравнению с клетками, поляризованными в M2 фенотип интерлейкином 4 или дексаметазоном.

Мы предположили, что выраженный стимулирующий эффект M2(LS) связан с продукцией профиброгенных и ангиогенных факторов. Действительно, M2(LS) практически двукратно превышали макрофаги других фенотипов по продукции TGF- β 1 и более чем в 2,7 раза — ангиогенина, а также характеризовались более высоким уровнем VEGF (2870 пг/мл, $p_w=0,07$ по сравнению с другими подтипами).

Таким образом, M2 макрофаги, поляризованные в результате эффероцитоза, представляют собой перспективный материал для разработки новых подходов к лечению ран, ассоциированных с нарушением процессов репарации.

Благодарим ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН за предоставление линии дермальных фибробластов NAF1.

Литература:

1. Spiller KL, Koh TJ. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2017. V. 122. P. 74–83.
2. Hume D.A. Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 370.
3. Li M., Hou Q., Zhong L., Zhao Y., Fu X. Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 681710.
4. Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Scand. J. Immunol. 2016. V. 83. №2. P.151–159.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОНКОТРАНСФОРМАЦИИ ТИРЕОИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ

П.Е. Максимова, Е.А. Непритимова, Д.В. Зима

*ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия*

e-mail: evgu79@mail.ru

Ключевые слова: онкотрансформация клеток, тироциты, апоптоз, молекулярная диагностика, папиллярный рак, щитовидная железа, патогенез.

Высокая заболеваемость и динамика патоморфоза рака щитовидной железы, требуют совершенствования диагностических подходов и новых данных для персонализированной диагностики, профилактики и лечения [1]. В литературе имеются данные о роли очень распространенного триггера — стресса в развитии патологии щитовидной железы, а также в нарушении сигнальных путей апоптоза и онкотрансформации клеток [2]. Цель нашего исследования — разработать методический подход выявления значимых для практики молекулярно-генетических закономерностей онкотрансформации тиреоидного эпителия с целью выделения разных групп пациентов с точки зрения диагностики и патогенетической терапии.

Материал и методы исследования. Выполнено комплексное экспериментально-клиническое исследование на лабораторных животных (самцы и самки белых крыс зрелого возраста с моделью острого и хронического

иммобилизационного стресса, $n=40$) и фрагментов ткани щитовидной железы и пунктатов клеток пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы из популяции жителей Республики Крым. Выполнены морфологические (световая и электронная микроскопия) и молекулярные исследования (иммуногистохимии и иммуноцитохимия с маркерами FAS-R, bcl-2, Ki-67).

Наши эксперименты *in vivo* и изучение материала пациентов дали сопоставимые результаты. Стресс является пусковым фактором дисрегуляции клеточного цикла. Трансформация тироцитов тесно связана с активацией внешнего и внутреннего пути апоптоза и ингибированием антиапоптотического фактора. Морфология трансформации тироидного эпителия — это часто феномен исключений и уникальности, что затрудняет попытки морфологов удовлетворить запрос хирургов на адекватную предоперационную диагностику и выработать оптимальную тактику. Молекулярные маркеры в сложных диагностических случаях на предоперационном этапе могут решить эти задачи при расчете индекса злокачественности как производного из количественных результатов иммуноцитохимического исследования.

Это позволило выявить патогенетическую основу и выработать методический подход для выявления клинически значимых молекулярных закономерностей онкотрансформации тироидного эпителия. Это способствует оптимизации алгоритма работы с такими больными с точки зрения пациент-ориентированного мультидисциплинарного подхода. Работа получила поддержку из госзадания No FZEG-2020-0060 «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий».

Литература:

1. Воробьев С.Л. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: Издательско-полиграфическая компания «КОСТА»; 2014, 158 с.
2. Feldkamp J., Führer D., Luster M., Musholt T.J., Spitzweg C., Schott M. Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules *Dtsch Arztebl* 2016 V 113(20). P. 353–359.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЯ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ПОЛИАМИДА-6 НА АДГЕЗИЮ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

С.Н. Малахов¹, М.А. Евтеева¹, А.В. Родина¹, М.М. Алексанян², А.Г. Аганесов², С.Н. Чвалун¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБНУ Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: s.malakhov@mail.ru

Ключевые слова: электроформование, нетканые материалы, полиамид-6, фибробласты.

На сегодняшний день одной из наиболее перспективных и стремительно развивающихся групп материалов составляют синтетические полимерные носители, используемые в тканевой инженерии для трансплантации клеток и регенерации поврежденных тканей. Метод электроформования, используемый для изготовления волокнистых трехмерных матриц, позволяет точно контролировать внутреннюю архитектуру матрикса. Высокая пористость делает такие матрицы очень привлекательными для тканевой инженерии, т.к. от пористости

матрикса зависит васкуляризация и восстановление тканей за счет диффузии газов и поступления питательных веществ. Один из наиболее широко используемых полимеров в электроформовании — полиамид-6. Нетканые материалы из полиамида-6 могут быть применены в широком спектре отраслей — от фильтрации аэрозолей [1] и сорбции нефти [2] до тканевой инженерии [3]. При этом, полиамид может быть переработан в волокна как из раствора, так и расплава.

В данной работе исследовано влияние структуры нетканых материалов из полиамида-6, полученных различными способами (из раствора или расплава, с отжигом и без), на адгезию и пролиферативную активность легочных эмбриональных фибробластов человека линии LECN. Нетканый материал, полученный электроформованием расплава полиамида-6, характеризуется волокнами со средним диаметром 2,2 мкм, а плотность упаковки волокон в полотно составила 4,6%. Материалы, полученные из раствора, имели средний диаметр волокон 3,5 мкм и плотность упаковки 6,0%. После отжига матриц плотность упаковки возросла до 6,2% (расплав) и 7,2% (раствор).

Исследование скорости адгезии клеток на волокнистые матрицы показало, что клетки более эффективно прикреплялись к матрицам, полученным из расплавов. Количество клеток через 168 часов культивирования также было значительно выше на матрицах, полученных из расплава по сравнению с матрицами из раствора. Стоит отметить, что скорость пролиферации клеток на матрицах, полученных после отжига, была ниже как в случае их получения из раствора, так и из расплава, что связано с увеличением плотности упаковки волокон в материалах в процессе отжига.

Литература:

1. Malakhov S.N., Belousov S.I., Shcherbina M.A. et al. *Polymer Science, Series A*. 2016. V. 58. P. 236.
2. Malakhov S.N., Chvalun S.N. *Nanotechnologies in Russia*. 2020. V. 15. P. 451.
3. Zhuravleva M., Gilazieva Z., Grigoriev T.E. et al. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 2018. V. 107. P. 253.

ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ПРОТЕИНОПАТИЙ, ВЫЗВАННЫХ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО БЕЛКА ХАНТИНГИНА

А.А. Малахова¹, В.С. Макеева¹, С.П. Медведев¹, С.М. Закиян¹

ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: amal@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: ИПСК, клеточные модели, мутантный хантингтин, белки семейства 14-3-3

Болезнь Хантингтона — наследственное аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, причиной которого является экспансия кодона CAG, кодирующего аминокислоту глутамин (Q), в первом экзоне гена *Huntingtin* (*HTT*). Мутантный белок хантингтин, содержащий удлиненный полиглутаминовый тракт (polyQ), теряет нативную конформацию, что ведет к нарушению выполнения им своих функций, и вызывает формирование белковых агрегатов в клетках. Агрегация аномального белка в срединных шипиковых нейронах полосатого тела оказывает негативный эффект на функционирование клеток головного мозга и приводит к их гибели. На более

поздних стадиях болезни нейродегенерация распространяется и на нейроны коры больших полушарий мозга.

Для изучения патологических процессов, приводящих к гибели нейронов, нами созданы клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Важным преимуществом такой модели является способность к неограниченной пролиферации в культуре, а также возможность дифференцировки в различные типы клеток организма человека. Кроме того, технология получения ИПСК из соматических клеток взрослого человека позволяет создавать пациент-специфические модели, пригодные для тестирования потенциальных лекарственных препаратов с учетом индивидуальных генетических особенностей организма. Помимо пациент-специфичных ИПСК, важную роль в изучении вклада мутантного хантингина в развитие патологии играют изогенные линии ИПСК, полученные путем внесения удлиненного тракта повторов CAG в геном (первый экзон гена *HTT*) клеток, полученных от здорового донора.

Активными участниками процессов белкового гомеостаза в клетке являются белки семейства 14-3-3. Изучение изменений в составе интерактома 14-3-3, вызванных экспрессией мутантного белка хантингин, поможет понять молекулярные механизмы развития патологии и найти мишени для терапевтического воздействия. Для изучения состава интерактома 14-3-3 на изогенных клеточных линиях, моделирующих болезнь Хантингтона, проведен трансгенез ИПСК генетическими конструкциями, экспрессирующими белки 14-3-3 ζ и 14-3-3 ϵ с эпитопами 3xFLAG и 2xStrepTagII. Наличие дополнительных эпитопов позволяет выделять комплексы взаимодействующих белков с помощью тандемной аффинной очистки. Получены клоны ИПСК здорового пациента и изогенных линий, содержащих удлиненный тракт повторов CAG (69Q) в гене *HTT*, которые несут доксициклин-управляемые трансгены 14-3-3-3xFLAG-2xSTII в локусе *AAVS1*. Экспрессия трансгена подтверждена Вестерн-блот анализом. Детальное изучение интерактома белков семейства 14-3-3 внесет вклад в понимание молекулярных механизмов патогенеза болезни Хантингтона. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ

А.Б. Малашичева, А.А. Лобов, Д.А. Переплетчикова, Д.А. Костина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: malashicheva@incras.ru

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка, мезенхимные стволовые клетки, Notch, эндотелий.

Остеогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток является многоступенчатым процессом, который протекает сходным образом в норме при развитии костной ткани, и при патологиях таких, как кальцификация сосудов и клапанов сердца. Показана роль отдельных генов и сигнальных каскадов в формировании костной ткани, сопутствующем ангиогенезе, а также в патогенезе ряда заболеваний, связанных с нарушением остеогенной дифференцировки. В то же время, ранние инициаторные механизмы остеогенной дифференцировки всё ещё

остаются неясными [1]. Одним из ключевых факторов, потенциально влияющих на остеогенную дифференцировку мезенхимных клеток, является их происхождение.

Мы провели сравнение шести типов мезенхимных клеток человека (МСК). В работе использовали первичные культуры МСК из тканей зуба (МСК пульпы зуба, МСК фибробластов связки и десны), жировой ткани (МСК жировой ткани), кости (остеобласты) и пуповины (МСК из Вартонова студня).

Клетки индуцировали к остеогенной дифференцировке с использованием остеогенной среды, затем выделяли РНК и белок для молекулярно-биологических исследований на 2-й и 10-й день остеогенной дифференцировки. Анализ транскриптома, секретома и протеома шести типов МСК показал высокую согласованность между разными типами данных. Все шесть типов МСК демонстрировали разные паттерны экспрессии как в недифференцированном состоянии, так и при дифференцировке, и эти паттерны сходны у клеток, имеющих сходное происхождение. Это свидетельствует о различных механизмах остеогенной дифференцировки в зависимости от типа ткани, что следует учитывать при осмыслении регенеративных стратегий соответствующих тканей.

Показана критическая роль контакта эндотелиальных клеток с МСК в процессе остеогенной дифференцировки и также продемонстрирована ключевая роль сигнального пути Notch при остеогенной дифференцировке МСК в присутствии эндотелиальных клеток.

Проведенные исследования демонстрируют возможность управления остеогенной дифференцировкой при помощи модификации эндотелиальных клеток, направляющих дифференцировку МСК, как в сторону усиления дифференцировки, так и в сторону ее подавления. Работа поддержана грантом РФФИ 19-29-04082.

Литература:

1. Lobov A., Malashicheva A. *Biological Communications*. 2022. V. 67, № 1. P. 32–48.

ПОВЫШЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ СКАФФОЛДА ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТЕЙ КРИТИЧЕСКИХ РАЗМЕРОВ

Д.В. Мальчикова

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

e-mail: dvmalchikova@gmail.com

Ключевые слова: репаративный остеогенез, оппозиционный рост, костный дефект, критический размер.

Основной причиной формирования костного дефекта челюсти критического размера являются одонтогенные воспалительные заболевания [1]. Использование гранулированных остеокондуктивных костно-пластических материалов (ГМ) для направленной костной регенерации не всегда приводит к желаемому результату. Методы тканевой инженерии облегчают производство биоинженерных конструкций в составе с биоразлагаемыми носителями [2,3].

Целью исследования является разработка способа повышения адсорбционной ёмкости ГМ для увеличения остеоиндуктивных свойств скаффолда.

В этом исследовании использовались пять наиболее часто используемых ГМ: Maxresorb, Bio-Oss, Cerabone, Xenograft Collagen, Osteon II. Для определения

адсорбционной способности с поверхности ГМ путем дегазации удаляли грубые крошки, мелкую пыль и пузырьки воздуха. Пассивную дегазацию проводили в физиологическом растворе при 37°C в течение 20 минут. Далее проводили активную дегазацию в лимонной кислоте с pH1 при 37°C в течение 10 минут, с последующим ультразвуковым воздействием УЗУ-О,25 в течение 60 секунд на частоте 18 кГц и мощности 250 Вт.

По результатам сканирующей электронной микроскопии во всех ГМ на внутренних поверхностях каналов и пор уменьшилось содержание крупнодисперсной крошки, мелкодисперсной пыли и пузырей воздуха. Нами рассчитаны показатели адсорбционной ёмкости исследуемых ГМ. Экспериментально выявлено, что значение фактической адсорбционной ёмкости может быть использовано для определения объема факторов роста кости, адсорбированного трансплантатом, который материал может размещать на своих поверхностях.

Таким образом, очищенные поры и каналы позволяют увеличить площадь контакта с внутренними поверхностями графта компонентов микроциркуляторного русла, жидкости, клеточных элементов и разместить требуемое количество факторов роста кости.

Литература:

1. H.Schilephake Int. J. Oral Maxillofac. Surg. — 2002. — № 5. — P. 469–484.
2. T.Tian, T.Zhang, Y. Lin Journal of Dental Research. — 2018. — Vol. 97(9). — P. 969–976.
3. V. Wu, Ma. Helder, N. Bravenboer, C. Bruggenkate, J. Klein-Nulend Hindawi Stem Cells International. 2019. P. 1–15.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ 14-СУТОЧНОГО АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ НА СТРОМАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ КОСТНОГО МОЗГА И КОСТНОЙ ТКАНИ БЕДРЕННОЙ И БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТЕЙ КРЫС ЛИНИИ W1STAR

Е.А. Маркина, П.И. Бобылева, И.В. Андрианова, Е.А. Тырина, Л.Б. Буравкова

ГНЦ РФ — ИМБП РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: микрогравитация, костная ткань, остеогенез

Микрогравитация негативно сказывается на состоянии костной ткани. В условиях реального космического полета, наиболее сильные проявления остеопении у космонавтов и астронавтов, выражены в дистальных отделах нижних конечностей и отделах позвоночника, ответственных за поддержание позы.

Гомеостаз костной ткани зависит от функциональной активности стромальных предшественников кости и костного мозга. Данных о влиянии микрогравитации на стромальные предшественники, вовлекаемые в ремоделирование костной ткани, немного. Поэтому многие вопросы, связанные с потенциалом малодифференцированных стромальных предшественников, локализованных в костном мозге и костной ткани, в условиях опорной разгрузки остаются открытыми.

Цель исследования — повести анализ морфофункционального состояния мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга и костной ткани, полученных из бедренной и большеберцовой костей крыс после 14-суточного антиортостатического вывешивания

(наземная модель микрогравитации *in vivo*) и 14-суточного периода реадaptации.

Для исследования были взяты самцы крыс линии Wistar 4–6-месячного возраста, следующих групп: виварный контроль, антиортостатическое вывешивание (АОВ) и 14-суточная реадaptация. Были определены пролиферативный и остеогенный потенциал МСК, а также транскриптомная активность генов, ответственных за гомеостаз костной ткани (*Mmp9, Spp1, Runx2, RANKL, OPG, Ibsp, BMP10, Sost, Alpl*).

АОВ приводило к уменьшению клеточного прироста и остеогенного потенциала стромальных прогениторов костного мозга и костной ткани бедренной и большеберцовой костей. Анализ транскриптомной активности показал снижение экспрессии генов, ответственных за остеосинтез и увеличение экспрессии генов, приводящих к остеорезорбции. Более выраженные негативные изменения наблюдались в клетках большеберцовой кости. В период реадaptации не происходило полного восстановления остеопотенциала и транскриптомной активности клеток из костной ткани и костного мозга большеберцовой кости.

Таким образом, опорная разгрузка приводит к снижению остеогенных свойств МСК на транскриптомном и функциональном уровнях. Этот эффект был более выражен в МСК костного мозга и костной ткани дистальных отделов конечностей. Работа выполнена по программе фундаментальных исследований ГНЦ РФ — ИМБП РАН № 65.3

БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИОННО-ТРЕКОВОЙ МЕМБРАНЫ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ХИТОЗАН-КОЛЛАГЕНОВЫМИ НАНОВОЛОКНАМИ

П.А. Марков¹, И.И. Виноградов², Е. Костромина¹, П.С. Еремин¹, И.Р. Гильмутдинова¹, А.П. Рачин¹, А.Н. Нечаев²

¹ НМИЦ реабилитации и курортологии Минздрава России, Москва, Россия

² Объединённый институт ядерных исследований, Дубна, Россия

e-mail: p.a.markov@mail.ru

Ключевые слова: трековые мембраны, коллаген, хитозан, раневой покрытие, биополимеры, нановолокна.

Исследование проведено с целью охарактеризовать влияние химического и термического способа стабилизации биополимерного слоя ионно-трековой мембраны на её физико-химические и биофункциональные свойства.

В исследовании использовалась полиэтилентерефталатная пленка, перфорированная ионами тяжелых металлов (Xe, Kr) на ускорителе ядерных частиц. Нанесение биополимерного слоя из раствора хитозана и коллагена проводили методом электроспиннинга, с использованием установки Nanop — O1A (MECC Co. LTD Япония). Для стабилизации биослоя использовали термическую (120°C, 60 мин) и химическую (в парах глутарового альдегида, 60 мин) обработку.

Установлено, что тип обработки не влияет на структуру биослоя, основным структурным элементом биослоя являются спонтанно переплетенные между собой волокна, толщиной 170 ± 40 нм. Выявлено, что термическая обработка вызывает увеличение дзета-потенциала биоматериала и повышает сорбционную ёмкость в отношении

бычьего сывороточного альбумина. Установлено, что термический способ стабилизации биополимерного слоя не оказывает ингибирующего действия на пролиферативную активность адгезированных фибробластов человека, в то время как химическая обработка снижает пролиферативную активность клеток, однако сохраняя при этом жизнеспособность клеток.

Таким образом, установлено, что, варьируя способ фиксации биополимерного слоя, можно регулировать физико-химические и биофункциональные свойства биоматериала. Сочетание высокой биосовместимости натуральных полимеров и стабильности синтетических материалов может быть успешной стратегией при изготовлении раневых покрытий нового типа, с заданными функциональными свойствами.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИОННО-ТРЕКОВОЙ МЕМБРАНЫ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ХИТОЗАН-КОЛЛАГЕНОВЫМИ НАНОВОЛОКНАМИ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

П.А. Марков¹, И.И. Виноградов², Е. Костромина¹, П.С. Еремин¹, И.Р. Гильмутдинова¹, А.П. Рачин¹, А.Н. Нечаев²

¹ *НМИЦ реабилитации и курортологии Минздрава России, Москва, Россия*

² *Объединённый институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

e-mail: p.a.markov@mail.ru

Ключевые слова: трековые мембраны, коллаген, хитозан, раневой покрытие, биополимеры, средства доставки.

Успешной регенерации кожных покровов, в результате ранений различного генеза (механические, термические или химические поражения) может препятствовать ряд факторов, среди которых ключевое значение играет контаминация раневого ложа патогенной микрофлорой. Изоляция раны от экзогенной микрофлоры и своевременная доставка в раневое ложе антибиотиков может повысить эффективность лечения кожных ран.

Цель исследования оценить сорбционные свойства ионно-трековой мембраны модифицированной электропрядным слоем из хитозана и коллагена.

В исследовании использовалась полиэтилентерефталатная пленка, перфорированная ионами тяжелых металлов (Xe, Kr) на ускорителе ядерных частиц. Нанесение биополимерного слоя из раствора хитозана и коллагена проводили методом электроспиннинга, с использованием установки Nanop — O1A (MECC Co. LTD Япония). Для стабилизации биослоя использовали термическую (120 °С, 60 мин. Для насыщения биоматериала антибиотиком исследуемые образцы погружали в раствор гентамицина (40 мг/мл) на 60 минут, после чего высушивали при 37 °С.

Установлено, что после нанесения электропрядного слоя на поверхность трековой мембраны сорбционная емкость биоматериала, в отношении гентамицина, увеличивается на 80%. Модифицированный биоматериал обладает повышенной продолжительностью высвобождения гентамицина, максимум высвобождения гентамицина приходится на первые 60 мин. инкубации. Показано, что полученный биоматериал не оказывает цитотоксического действия на клетки и поддерживает пролиферативную активность фибробластов.

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность использования модифицированной

ионно-трековой мембраны в качестве компонента раневых покрытий с улучшенными функциональными свойствами.

ИЗМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ IN VITRO

Д.К. Матвеева¹, Д.Н. Каширина¹, М.И. Ездакова¹, А.Ю. Ратушный¹

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

e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, внеклеточный матрикс, клеточное старение.

Исследование процессов старения является актуальной задачей регенеративной медицины. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) — важные участники поддержания гомеостаза в различных тканях, поскольку обладают широким секреторным профилем. В том числе МСК продуцируют внеклеточный матрикс (ВКМ), молекулы которого вовлечены в регуляцию функциональной активности клеток. Изучение ремоделирования ВКМ у сенесцентных МСК может внести вклад в понимание процессов старения их ниши.

Для получения сенесцентных МСК (линия ASC52telo) применяли подход стресс-индуцированного старения с помощью митомицина С (МмС). После 10 дней культивирования характеризовали ВКМ, накопленный под монослоем «молодых» (МмС-) и сенесцентных (МмС+) МСК, а также после децеллюляризации (дцВКМ) с помощью гистологического окрашивания и масс-спектрометрии. Депонированные в дцВКМ факторы роста изучали с помощью иммуоферментного анализа. Для оценки транскрипции генов ВКМ использовали количественный ПЦР анализ.

У сенесцентных МСК было выявлено снижение продукции структурных молекул ВКМ и усиление протеолитических процессов. Полуколичественный анализ после окрашивания коллагеновых и неколлагеновых белков продемонстрировал снижение тотального содержания данных компонентов ВКМ у МмС+ МСК в 1,6 раз и 1,9 раз, соответственно. Также было установлено снижение экспрессии генов, кодирующих коллаген 1 типа (COL1A1), эластин (ELN) и фибронектин (FN) и увеличение экспрессии гена коллагеназы MMP1 в 3 раза у МмС+ МСК. Масс-спектрометрически было выявлено, что в экстракте дцВКМ от МмС+ по сравнению с МмС- МСК снижено содержание структурных белков ВКМ: коллагенов (COL1A2, COL3A1, COL6A1-A3), адгезионных и регуляторных гликопротеинов (FBLN1, FBLN2, EMIL1, POSTN, TNC, MXRA5, TGFBI). При этом было идентифицировано увеличение содержания ряда белков ВКМ, которые участвуют в регуляции активности плазмина (PAI1 и PAI2, A2M, VTN). В клеточных лизатах сенесцентных по сравнению с «молодыми» МСК обнаружено уменьшенное количество ферментов, отвечающих за организацию коллагеновых фибрилл, таких как PLOD1-3, P4HA1, P4HA3, PCOC1, LOXL1.

С помощью иммуоферментного анализа в экстракте дцВКМ от МмС+ МСК было выявлено увеличение содержания факторов роста CTGF и снижение VEGF. Среди других секретируемых факторов, идентифицированных масс-спектрометрически, в сенесцентных

МСК обнаружено увеличение продукции GDF15, ассоциированного с клеточным ответом на стресс, и отсутствие продукции важного хемокина гемопоэтической ниши — CXCL12.

Таким образом, структурно-функциональная модификация ВКМ может быть одной из причин смещения тканевого гомеостаза при старении и служить фактором риска для развития ряда патологий. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10117.

СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЁМА СИСТЕМЫ ВНУТРИКОСТНЫХ ПРОСТРАНСТВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СКОРОСТИ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ

И.В. Матвейчук¹, В.В. Розанов^{1,2}

¹ ФГБНУ Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: mivilar@mail.ru

Ключевые слова: костная ткань, система внутрикостных пространств, остеointegrация, регенерация, биоимплантология.

Система внутрикостных пространств (СВП) является одним из структурных феноменов костной ткани [1]. Она играет важную роль в жизнедеятельности костно-суставного аппарата и может быть использована для решения актуальных задач современной биоимплантологии. Морфометрический анализ параметров дефинитивных элементов СВП [1, 2] с учётом уровней структурной организации указывает на необходимость увеличения её объёма и размеров поперечных сечений каналов (пор) с целью повышения скорости остеointegrации. В нативной кости объём СВП составляет 10–20% в зависимости от биологических факторов (пол, возраст, раса, индивидуальные особенности и др.). Этот показатель может возрастать до 30% при селективном выделении из кости основных её фаз при деминерализации или деорганификации [1].

Увеличение объёма и размеров поперечных сечений каналов (пор) можно обеспечить нанесением перфораций на поверхности и в объёме костных фрагментов [3] физико-механическими методами при обеспечении высокого качества вновь создаваемых поверхностей [4]. При этом существует возможность использования естественных и искусственно созданных полостей в качестве депо лекарственных средств для направленной доставки их в зону оперативного вмешательства.

СВП имеет важное значение и для стерилизации костных имплантатов, достижение микробиологического соответствия которых является одним из главных требований обеспечения безопасности реципиентов и сотрудников банков тканей [5]. Работа выполнена в рамках государственного задания FGUU-2022-0008-1 22022600100-2 и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Литература:

1. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омельяненко Н.П. и др. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеопатологии. М.: ОАО «Типография «Новости», 2005. 336 с.
2. Луньков А.Е. Порометрические методики морфометрии костной ткани. Саратов: Изд-во Саратовского медицинского университета, 2015. 120 с.

3. Омельяненко Н.П., Шапошников Ю.Г., Базанова Э.Б. и др. Патент № 2 121 815 на изобретение от 20.11.1998 г.
4. Литвинов Ю.Ю., Матвейчук И.В., Розанов В.В. и др. Российский журнал биомеханики. 2021. Т. 25. № 2. С. 186.
5. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. Изв. РАН. Сер. физ. 2021. Т. 85. № 5. С. 745.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ НЕОАНГИОГЕНЕЗА ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

С.С. Махотин, С.В. Сдобникова

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

e-mail: sдобnikova_sv@mail.ru

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, классификация

Пролиферативная диабетическая ретинопатия (ПДР) остается одной из главных причин слепоты. Несмотря на признание основного значения системных факторов, методы ее лечения связаны исключительно с интраокулярным воздействием. Это свидетельствует о том, что основные факторы, влияющие на течение данного состояния не известны. Вместе с тем существует вероятность регресса неососудов (НС) без интраокулярного лечения, что является доказательством обратимости процесса [1]. Поскольку развитие и регресс НС — разнонаправленные процессы, их разделение является принципиальным при формировании дизайна исследований. В существующей классификации ПДР данные соображения не учитываются.

На основании сопоставления клинического и патоморфологического изучения вариантов эволюции ПДР, в рамках проведенного с 1997 по 2019 годы исследования, было выявлено, что патологический ангиогенез является основным событием, а фазы развития и регресса НС имеют четкие признаки. Определяющим в жизненном цикле НС является наличие или отсутствие их гемоперфузии.

Нами предложена новая классификация эпицентров ангиогенеза (ЭА) при ПДР с учетом фазы жизненного цикла неососудов (развитие, стабилизация (пауза) или регресс) и стадии развития НС (капилляры; неососуды среднего калибра и капилляры; все отделы, включая магистральные неососуды). Фазы жизненного цикла эпицентров были обозначены буквами: V — развитие (от лат. *vigent* — цветущий); P — стабилизация (P — *pause* — пауза), M — регресс (*Moriens* — погибающий). Степень развития НС были обозначены цифрами 1–3: 1. наличие только капилляров; 2. наличие капилляров и НС среднего калибра; 3. наличие всех звеньев сосудистой системы. Каждый ЭА обозначался буквой и цифрой, например: V1. При патоморфологическом исследовании предложенная классификация подразумевает обязательное клиникоморфологическое сопоставление.

Таким образом, данная классификация ПДР позволяет: 1. изменить принцип формирования групп патоморфологических и клинических исследований с целью получения более корректных результатов; 2. изучить ассоциацию фаз эволюции ПДР с динамикой соматического статуса пациента и индивидуализировать подход к лечению.

Литература:

1. Сдобникова С.В. Офтальмология. 2021; Т. 18. № 4. С. 763–768.

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ ДЛЯ ГЕРНИОПЛАСТИКИ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Русинова¹, Е.А. Солоп^{1,2}, С.Б. Базлов¹, И.И. Карташевский¹

¹ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

e-mail: cnil.ksma@yandex.ru

Ключевые слова: герниопластика, ацеллюлярный дермальный матрикс, иммуногистохимия.

Герниопластика, на сегодняшний день, является одной из самых частых хирургических операций в мировой практике. Однако использование натяжной пластики приводит к негативным последствиям таким как рецидивы, свищи и хронические боли, в связи с этим актуален поиск оптимальных поддерживающих материалов [1, 2]. На данный момент существуют различные хирургические материалы как синтетического, так и природного происхождения, основными требованиями к которым являются неиммуногенность, отсутствие токсичности и прочность. Целью данного исследования была оценка биосовместимости ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ) на основе дермы свиньи, применяемого в качестве поддерживающего материала для проведения герниопластики.

Исследование выполнялось в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Основой для создания материала была нативная дерма поросёнка породы Ландрас возрастом 4 месяца, которая подвергалась детергентно-энзиматической обработке. Экспериментальная герниопластика проводилась на свиные-грыженосителе породы Ландрас, размер грыжевых ворот составлял 8×3 см.

При определении иммуногенности полученного материала проводился количественный анализ ДНК, его содержание составило не более 50 нг /мкг ткани, что соответствует критерию качества децеллюляризации [3]. На 60-й день, после первичной герниопластики с применением АДМ, отсутствовала воспалительная реакция в тканях, вокруг имплантированного АДМ не образовалась соединительнотканная капсула. Биопсийный материал, взятый из области послеоперационного шва, исследовался при помощи иммуногистохимических маркеров CD3, CD31, CD68 и было установлено присутствие большого количества коллагена I типа, фибробластов и эндотелиоцитов, характерных для плотной соединительной ткани.

В результате проведенного эксперимента было отмечено, что разработанный нами АДМ может применяться в качестве поддерживающего материала для герниопластики.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00199.

Литература:

1. Gavriilidis P., Davies R.J., Wheeler J. et al. *Hernia*. 2019. V. 23. № 6. P. 1093.
2. Buenafe A.A., Lee-Ong A. *Ann Laparosc Endosc Surg*. 2019. V. 4. C. 24.
3. Bühler N.E., Schulze-Osthoff K., Königsrainer A. et al. *J Biosci Bioeng*. 2015. V. 119. № 5. P. 609.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Русинова¹, И.В. Супрун^{1,2}, А.С. Асякина¹, Я.А. Козмай¹, А.А. Козлова¹

¹ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

e-mail: cnil.ksma@yandex.ru

Ключевые слова: цитотоксичность, гидрогель, коллаген, дерма свиньи, дермальные фибробласты.

На данный момент коллагеновые гидрогели представляют собой перспективные биоматериалы, которые могут быть прим. мы в различных направлениях биомедицины, клеточных технологиях и тканевой инженерии [1]. Основной проблемой, связанной с использованием разработанных биоматериалов *in vivo*, является их потенциальная токсичность для живого организма [2]. Если в процессе гелеобразования используется химическая обработка исходного материала, то необходимо учитывать цитотоксичность полученного образца в отношении животных клеток [3]. Целью нашего исследования являлась оценка цитотоксичности разработанного нами репаративного гидрогеля на основе дермы свиньи.

Исследование выполнялось в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Для оценки цитотоксических свойств был произведен анализ жизнеспособности клеточной линии дермальных фибробластов DF-1, совместно с коллагеновым гидрогелем в разных соотношениях, с последующей оценкой пролиферации и жизнеспособности методом Live/Dead через 24 и 72 часа инкубации согласно инструкции производителя. В качестве контроля использовалась лунка с полной питательной средой без добавления гидрогеля.

Анализ результатов оценки жизнеспособности продемонстрировал отсутствие токсических эффектов гидрогеля на культуру дермальных фибробластов. На первые сутки инкубации наибольшая жизнеспособность клеток отмечалась в контрольных лунках, однако через 72 часа культивирования количество жизнеспособных клеток увеличилось в присутствии гидрогеля для всех исследуемых соотношений, что свидетельствовало о хорошей пролиферационной способности клеток в отношении исследуемого биоматериала. Во всех исследуемых концентрациях гидрогеля не наблюдалось снижения процента жизнеспособности клеточной культуры ниже 72%. При этом материалы считаются биосовместимыми при проценте жизнеспособности более 70% в соответствии с критериями стандарта ISO10993-5 [4].

Таким образом, полученные результаты показали, что клетки в биодермальном гидрогеле оставались жизнеспособными, исследуемый материал не был цитотоксичен и может быть использован для дальнейших исследований.

Литература:

1. Sharifzadeh G., Hosseinkhani H. *Adv Healthc Mater*. 2017. V. 6. № 24. C. 1700801.
2. Yang X., Bakaic E., Hoare T. et al. *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. № 12. P. 4447.
3. Mironi-Harpaz I., Wang D.Y., Venkatraman S. et al. *Acta biomaterialia*. 2012. V. 8. № 5. P. 1838.
4. Sunthornpan N., Watanabe S., Moolsradoo N. *J Phys*. 2018. V. 1144. № 1. P. 012013.

ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТКИ С МИКРОДЕЛЕЦИЕЙ Xq24

А.Г. Мензоров^{1,2}, **И.Е. Пристяжнюк**¹,
Н.И. Мещеряков^{1,2}, **Т.В. Никитина**³,
Е.Н. Толмачева³, **Л.И. Минайчева**³,
Л.П. Назаренко³, **И.Н. Лебедев**³

¹ 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

e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: ИПСК, микроделеция Xq24, синдром дефицита UBE2A, привычное невынашивание беременности, асимметричная инактивация X-хромосомы.

Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов и условно здоровых доноров, позволяет изучать генетические аномалии *in vitro*. Ранее мы описали клинический случай привычного невынашивания беременности у пациентки с асимметричной инактивацией X-хромосомы в периферических лимфоцитах, буккальном эпителии и эндометрии [1]. С помощью aCGH мы выявили микроделецию Xq24 размером 239 т.п.о., затрагивающую восемь генов. Получение ИПСК позволит изучать асимметричную инактивацию X-хромосомы и другие последствия микроделеции как в плюрипотентных, так и в дифференцированных клетках.

Мы получили три линии ИПСК из фибробластов кожи пациентки. Репрограммирование проводили с помощью эписомных векторов (Thermo Fisher Scientific). Линии ИПСК имели нормальный кариотип, экспрессировали маркеры плюрипотентности, при дифференцировке в эмбриоидные тельца экспрессировали маркеры всех трех зародышевых листков.

Полученные линии ИПСК можно использовать для изучения асимметричной инактивации X-хромосомы. Получение ИПСК проведено на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепрофилактического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells>). Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063.

Литература:

1. Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P. et al. *Cytogenet Genome Res.* 2020. V. 160(5). P. 245.

СУБПОПУЛЯЦИЯ НЕСТИН ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ КЛЕТОК ВЫПОЛНЯЕТ РЕГУЛЯТОРНУЮ ФУНКЦИЮ В ХОДЕ АДИПОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

С.Э. Мирзаева, **М.А. Лазарев**, **Е.А. Сотская**,
П.С. Климович, **Н.И. Калинина**, **В.Ю. Сысоева**

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

e-mail: sabina.mirzaeva@chemistry.msu.ru

Ключевые слова: нестин, адипогенная дифференцировка, микровезикулы.

Нестин-экспрессирующие клетки, потомки клеток нервного гребня, контролируют активность гематопозитических стволовых клеток, регулируя, таким образом, обновление крови. Однако, роль таких клеток в поддержании состава других тканей, в частности, жировой ткани остается не выясненной. Ранее методом биоинформатического анализа клеток человека в контроле и при активации адипогенной дифференцировки было обнаружено, что в кластере, который содержит клетки с высоким уровнем экспрессии нестина, присутствуют клетки, в которых высокоэкспрессированы гены белков, участвующих в биогенезе везикул.

Целью данной работы было исследование динамики секреции везикул клетками Nes⁺ МСК мыши в ходе адипоцитарной дифференцировки МСК.

Исследование проводили на МСК подкожной жировой ткани молодых (8 недель) самцов мышей, экспрессирующих GFP под промотором маркерного белка клеток нервного гребня, нестина (линия Nes-GFP⁺). Тотальную популяцию МСК, выделенных из жировой ткани мышей линии Nes-GFP⁺ наращивали и разделяли с использованием клеточного сортера на нестин-экспрессирующие (GFP⁺), а также клетки со слабой экспрессией нестина (GFP^{dim}) и популяцию, не содержащую GFP. Клетки наращивали до конфлюентного монослоя и индуцировали адипоцитарную дифференцировку. Среду культивирования через 3, 6 и 9 суток дифференцировки собирали и анализировали количественный и качественный состав везикул с использованием NTA и проточной цитофлуориметрии.

Обнаружено, что продукция внеклеточных везикул достоверно выше у Nes⁺ МСК клеток на поздних стадиях адипогенной дифференцировки. С помощью анализа транскрипционного профиля Nes⁺МСК мы также показали, что экспрессия маркерных белков внеклеточных везикул в этих клетках выше, чем в других субпопуляциях. Кроме того, нами выявлены различия в профиле экспрессии генов транскрипционных факторов адипогенеза в клетках с разным уровнем экспрессии нестина. Полученные данные указывают на то, что Nes⁺МСК реагируют на индукцию адипогенной дифференцировки активацией продукции внеклеточных везикул. Такое повышение продукции везикул может свидетельствовать о том, что эти клетки в жировой ткани выполняют регуляторную функцию, взаимодействуя посредством везикул с окружающими клетками. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00402.

ПОЯВЛЕНИЕ СИНТЕЗА ДИСТРОФИНА У МЫШЕЙ MDX ПОСЛЕ НЕМИЗЛОАБЛАТИВНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ СЗНА

В.М. Михайлов, **А.В. Соколова**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: миодистрофия Дюшенна, дистрофин, костный мозг

Лечение моногенных заболеваний представляет как теоретический, так и практический интерес. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — это X-сцепленная рецессивная мышечная дистрофия, обусловленная мутацией в гене белка «дистрофин». МДД это распространенная мышечная дистрофия с летальным исходом.

Моделью МДД являются мыши mdx. Одним из подходов к восстановлению синтеза дистрофина является

трансплантация мышам mdx донорских стволовых клеток (СК). Трудность клеточной терапии МДД как у людей, так и у мышей mdx проистекает как из-за иммунологической несовместимости клеток доноров и реципиентов, так и из-за отсутствия у реципиентов толерантности к вновь синтезируемому донорскими клетками дистрофину. Замена мутантных клеток костного мозга (ККМ) реципиентов после рентгеновского облучения трансплантацией ККМ «дикого» типа является едва ли не единственным, способом преодоления иммунологической несовместимости клеток. В качестве доноров СК использовали ККМ мышей СЗНА (H-2^k), которые трансплантировали мышам mdx (C57BL/10, H-2^b).

(H-2 после немизлоаблативного R-облучения в дозе 3 Гр [1]. Для сохранения приживаемости трансплантированных клеток мышам mdx делали иммуносупрессорную терапию в виде инъекций циклофосфамида в дозах от 2 до 60 мг/кг веса тела. Появление синтеза дистрофина было зарегистрировано через 6 мес. после трансплантации при помощи кроличьих антител к дистрофину (Abscam, USA), меченных биотином, и, затем, стрептоаваидином-пероксидазой. Наиболее эффективной оказалась доза циклофосфамида 60 мг/кг. Несмотря на низкую долю обнаруженных дистрофин(+) поперечно-полосатых мышечных волокон (Д+ ППМВ) 4,6 ± 0,5%, возникновение синтеза дистрофина у мышей-реципиентов mdx также сопровождалось усилением экспрессии дистрофин-зависимых признаков таких как увеличение доли ППМВ без центральных ядер до 23 ± 2% (конт. mdx 11 ± 1%), восстановление структуры синапсов до 32 ± 2% (конт. mdx 10 ± 2%) и уменьшение гибели ППМВ до 0,7 ± 0,3% (конт. mdx 3,1 ± 0,6%). Появление синтеза дистрофина и снижение гибели ППМВ подтверждает продукцию дистрофина донорскими клетками. Описано, что синтез дистрофина на уровне 5% достаточен для выживаемости ППМВ мышей mdx [2]. Представленный результат расширяет поиск методов усиления синтеза дистрофина до 20% уровня, достаточного для терапии МДД мышей mdx [2, 3].

Литература:

1. Соколова А.В. и др. Гены & Клетки. 2020. Т. XV. № 1. С. 37.
2. van Putten V. et al. FASEB J. 2013. V. 27. P. 2484.
3. Wells D.J. J. Muscle Res. Cell Motil. 2019. V. 40 P. 144.

МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ СПИДРОИНОВ — ЭФФЕКТИВНАЯ ОСНОВА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ EX VIVO КАК НЕРВНОЙ ТКАНИ (ДОРСАЛЬНЫЕ ГАНГЛИИ), ТАК И СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ (ФРАГМЕНТЫ АОРТЫ)

М.М. Михайлова¹, К.В. Сидорук¹, Л.И. Давыдова¹, Е.В. Ястремский^{1,2}, С.Н. Чвалун¹, В.Г. Дебабов¹, В.Г. Богущ¹, А.А. Пантелеев^{1,3}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт Кристаллографии им. Шубникова ФНИЦ Кристаллография и фотоника, Москва, Россия

³ ФГБУ Нмиц Хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава РФ, Москва, Россия

e-mail: vlbogush@mail.ru

Ключевые слова: рекомбинантный спидроин, дорсальные ганглии, аорта, регенерация, рост аксонов, спраутинг аорты.

Рекомбинантные спидроины (РС, аналоги белков каркасной нити паутины пауков-кругопрядов) являются

перспективными биополимерами для стимуляции ранозаживления [1]. Недавние исследования показали, что РС способствуют регенерации нервов, стимулируя рост аксонов после повреждения в системах *in vitro* и *in vivo*. Однако регенерация нервной ткани зависит не только от роста аксонов, но и от восстановления сосудов в месте повреждения. Помимо непосредственного участия в ангиогенезе, эндотелиальные клетки синтезируют ростовые факторы, стимулирующие рост аксонов, определяют направление роста аксонов [2] и обладают фагоцитарной функцией, способствующей регенерации [3]. Т.о., материалы для регенерации нервной ткани должны поддерживать жизнеспособность не только нервных клеток, но и клеток сосудов. Однако, в настоящее время информация о материалах, эффективно поддерживающих как нервные, так и эндотелиальные клетки, практически отсутствует.

В данной работе показана способность матриксов из РС rS1/9 и rS2/12 поддерживать жизнеспособность как дорсальных ганглиев (ДРГ), так и эксплантов аорты (ЭА) из 5–7-дневных мышей линии C57Bl/6J. Для этого использовались вставки, покрытые rS1/9, а также нетканые матриксы из смеси РС с поликапролактоном (rS1/9:rS2/12:PCL=5:5:1) с хаотично или параллельно ориентированными волокнами. Проведена оценка влияния РС и топографии спидроиновых матриксов на миграцию клеток из ДРГ и ЭА, а также на рост аксонов с помощью метода иммунофлуоресценции. Показано следующее:

- Вставки из rS1/9 поддерживают жизнеспособность ДРГ и ЭА, стимулируя миграцию клеток из эксплантов и рост аксонов.
- Матриксы из РС успешно поддерживают рост аксонов и миграцию Шванновских клеток из ДРГ, независимо от ориентации волокон. В то же время, ориентированные волокна способны как направлять миграцию Шванновских клеток, так и направлять и ускорять рост аксонов ДРГ.
- Матриксы из РС поддерживают жизнеспособность ЭА. Ориентированные волокна матриксов направляют миграцию не только гладкомышечных, но и эндотелиальных клеток, не находящихся в непосредственном контакте с матриксом.
- rS1/9 стимулирует образование эндотелиальных спраутов аорты, тогда как на коллагене преимущественно формируется монослой эндотелиальных клеток.

Таким образом, РС поддерживают жизнеспособность и ДРГ, и ЭА. Органотипическая культура ДРГ или ЭА на матриксах из РС является адекватной моделью для изучения влияния топографии матриксов на процессы миграции и ориентации клеток в ходе регенерации нервной ткани в условиях сохранения структуры ткани. Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Debabov V.G., Bogush V.G. ACS Biomater.Sci.Eng. 2020. V. 6. № 7. P. 3745.
2. Cattin A-L., Burden J.J., Emmenis L.V., et al. Cell. 2015 V. 162. № 5. P. 1127.
3. Zhou T., Zheng Y., Sun L., et al. Nat Neurosci. 2019. V. 22. № 3. P. 421.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АДИПОЦИТАРНОЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОЙ АКТИВАЦИЕЙ ЭКСПРЕССИИ UCP1

**С.С. Мичурина^{1,2}, Ю.С. Стафеев¹, В.А. Труонг³,
М.Ю. Меньшиков¹, Ю.Ч. Ху³, Е.В. Парфёнова^{1,2}**

¹ ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России,
Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Национальный университет Цинь Хуа, Синчжу,
Тайвань

e-mail: michurinas192@gmail.com

Ключевые слова: CRISPRa, бакуловирус, UCP1, генная терапия, термогенез.

Нарушение системного энергетического гомеостаза, заключающееся в избыточном поступлении и сниженном расходовании энергетических субстратов, приводит к развитию ожирения и сахарного диабета 2 типа. Активация термогенеза жировой ткани сопровождается окислением глюкозы или жирных кислот с последующим выделением полученной энергии в виде тепла при активации разобщающего белка внутренней мембраны митохондрий UCP1. Благодаря способности утилизировать избыточную энергию трансплантация термогенной жировой ткани может способствовать предотвращению метаболических заболеваний. В настоящей работе мы разработали систему активации транскрипции (CRISPRa) для получения и трансплантации зрелых адипоцитов с повышенной экспрессией UCP1.

Для трансплантации использовали мезенхимные стромальные клетки мышцы, дифференцированные в зрелые адипоциты. Для активации экспрессии UCP1 мы создали систему CRISPRa-UCP1, содержащую dCas9, комплексы активации транскрипции и гидовые РНК, специфичные к UCP1. Доставку CRISPRa-UCP1 в адипоциты осуществляли с помощью бакуловирусной трансдукции. Модифицированные адипоциты смешивали с матриксом Matrigel и вводили мышам C57BL/6 в область ингинального жирового депо. Через 7 дней проводили глюкозотолерантный тест, измерение массы тела животных, сбор сыворотки крови. Тканеинженерные конструкции извлекали для анализа экспрессии UCP1 и белков метаболизма адипоцитов методами ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии.

На 7 день после трансплантации мы наблюдали увеличение мРНК UCP1 в 40 раз и белка в 4 раза в адипоцитарных тканеинженерных конструкциях, модифицированных CRISPRa-UCP1. Полученные тканеинженерные конструкции содержали зрелые адипоциты с жировыми каплями. Адипоциты экспрессировали гормончувствительную липазу и транскрипционный фактор PGC1 α , регулирующий белую и бежевую адипогенную дифференцировку. Трансплантация не повлияла на массу тела животных и толерантность к глюкозе за 7 дней воздействия. Трансплантация конструкций, не сопровождавшаяся инфильтрацией CD68⁺ макрофагами и не повышала концентрацию провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ-6 в сыворотке животных.

Разработанная система CRISPRa-UCP1 позволяет эффективно активировать экспрессию UCP1 для создания термогенных адипоцитов. Отсутствие системных метаболических эффектов тканеинженерных конструкций может быть связано с низкой продолжительностью воздействия и отсутствием метаболических нарушений у животных. Адипоциты, модифицированные системой

CRISPRa-UCP1, сохраняют морфологию и метаболические свойства после трансплантации и не вызывают активацию локального и системного воспаления. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности и отсутствии иммуногенности CRISPRa-UCP1 и бакуловирусной системы доставки. Работа поддержана грантом РФФ #20-45-08003.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОГО ПОЛУШАРИЯ В КАЧЕСТВЕ КОНТРОЛЯ: ИЗБЫТОЧНЫЕ И УПУЩЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

**И.В. Мозговой¹, И.Б. Филиппенков¹,
Ю.А. Ремизова¹, В.В. Ставчанский¹,
А.Е. Денисова², Л.В. Губский^{2,3},
С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹**

¹ ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ
Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный
исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия

³ ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий
ФМБА, Москва, Россия

e-mail: ivmstalker@gmail.com

Ключевые слова: ишемический инсульт, tMCAO, ипсилатеральное полушарие мозга, контралатеральное полушарие мозга, транскриптомика, RNA-Seq, микроРНК, микроРНК-мРНК взаимодействия.

Ишемический инсульт — одно из наиболее значимых заболеваний, нарушающих функции мозга. Изучение роли микроРНК как молекул со значительным регуляторным потенциалом позволяет составить более полное представление о молекулярном патогенезе инсульта. Подобные исследования обычно проводят на моделях животных, и особое значение имеет интерпретация получаемых данных в приложении к клинике. Часто для изучения процессов, протекающих в ипсилатеральном полушарии (ИП) мозга, в качестве контроля используют контралатеральное полушарие (КП) [1, 2]. Однако показано, что после инсульта в КП могут протекать процессы (распространяющаяся депрессия/деполяризация, трансполушарный диализ), отражающиеся на профиле экспрессии генов. В этой связи рациональной альтернативой КП является использование в качестве контроля образцов мозга ложнопериоперированных (ЛО) животных.

В данной работе с помощью RNA-Seq был исследован профиль экспрессии микроРНК в подкорковых структурах мозга крыс через 24 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии (tMCAO), выполненной под контролем магнитно-резонансной томографии. Мы проанализировали серию образцов из ИП, КП ишемизированных крыс и правого полушария мозга ЛО животных.

В результате, из 768 аннотированных микроРНК, 26 и 29 оказались дифференциально экспрессированными (ДЭМ) в ИП относительно КП и ЛО соответственно (кратность >1,5; *P*adj < 0,05). Только 16 ДЭМ оказались общими для обоих сравнений и могли отражать эффект ишемии в ИП вне зависимости от выбора контролей. При этом 10 ДЭМ были уникальными для сравнения с КП и 13 ДЭМ — с ЛО. Эти ДЭМ могли представлять

«избыточные» и «упущенные» результаты, соответственно, при использовании КП в качестве контроля. Для установления роли выявленных ДЭМ при инсульте с помощью баз данных mirDB и Targetscape были отобраны мРНК, являющиеся мишенями ДЭМ. Функциональный анализ генов, кодирующих мРНК-мишени, выявил 44 метаболических пути (KEGG), которые могут быть связаны с активностью ДЭМ. Только 13 путей (GnRH, MAPK, Dopaminergic synapse и др.) выделялись при использовании как КП, так и ЛО в качестве контроля, в то время как 31 путь (Focal adhesion, Wnt, GABA и др.) выделялся только с помощью одного из контролей. Большинство из них (29 путей) относились к «упущенным» результатам при использовании КП в качестве контроля.

Таким образом, использование КП и ЛО контролей позволило выявить микроРНК-сигналы биполушарных изменений в мозге крыс после tMCAO. Показано значительное влияние выбора контролей на получаемые результаты анализа ДЭМ в ИП и их функциональную интерпретацию. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-34-70048.

Литература:

1. Ramsay L.A., Quille M.L., Orset C. et al. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019. V. 6. № 9. P. 1681–95.
2. Wegner S., Uhlemann R., Boujon V. et al. *Mol Neurobiol.* 2020. V. 57. № 3. P. 1446–58.

ВЛИЯНИЕ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ НА АДЕНОВИРУСНУЮ ТРАНСДУКЦИЮ КУЛЬТУР ММСК

**В.О. Мокроусова^{1,2}, И.А. Недорубова¹,
А.Ю. Меглей², А.В. Васильев²,
Т.Б. Бухарова¹, Д.В. Гольдштейн¹**

¹ ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ ЦНИИСиЧЛХ Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные средства, ибупрофен, диклофенак, кетопрофен, аденовирусная трансдукция.

На данный момент генная терапия с использованием аденовирусных конструкций является одним из наиболее перспективных направлений в регенеративной медицине. Такой подход обеспечивает высокую эффективность трансдукции как делящихся, так и неделящихся клеток, позволяет переносить трансгены до 35 т.п.о. и исключает риск инсерционного мутагенеза. Однако, существенным недостатком применения аденовирусных конструкций является иммунный ответ организма и, как следствие, невозможность повторного использования данной вирусной системы. Для снижения иммунной реакции могут быть использованы нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). Целью исследования была оценка влияния различных НПВС на эффективность аденовирусной трансдукции и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Материалы и методы. В работе использовали ММСК, полученные из жировой ткани крыс. Клетки инкубировали в присутствии аденовирусных векторов с геном зеленого флуоресцентного белка (Ad-GFP) с вирусной нагрузкой

320 TCID₅₀/мл в течение 16 ч. В качестве НПВС были выбраны: ибупрофен (Ibu) в концентрации 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл и 0,125 мг/мл, диклофенак (Dic) в концентрации 0,015 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,3 мг/мл и кетопрофен (Ket) в концентрации 0,25 мг/мл, 1,25 мг/мл, 2,5 мг/мл. НПВС присутствовали в среде на протяжении всего исследуемого периода. На 1 и 3 сутки исследовали жизнеспособность клеток методом МТТ-теста и эффективность вирусной трансдукции по наличию клеток, содержащих флуоресцентный белок GFP с помощью микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Были подобраны оптимальные концентрации для каждого НПВС, не оказывающие существенного цитотоксического действия на ММСК (гибель не более 20% клеток). Жизнеспособность клеток через 3 суток инкубации для 0,125 мг/мл Ibu составляла 96,3±3,8%, для 0,015 мг/мл Dic — 81,0±2,5%, а для 0,25 мг/мл Ket — 79,9±1,0%. Эффективность трансфекции ММСК Ad-GFP через 3 суток составила при добавлении Ibu 60,0±1,6%, Dic — 31,4±7,9%, Ket — 51,7±5,7%, а в контрольной группе — 48,5±2,0% (в отсутствие НПВС).

Таким образом, Ibu является наиболее предпочтительным НПВС для использования с аденовирусными векторами, не вызывает гибели клеток и оказывает положительное влияние на трансдукцию ММСК. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.

ЛОКАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СНИЖАЕТ КОЛИЧЕСТВО M2 МАКРОФАГОВ В МОДЕЛЯХ ПОВРЕЖДЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

**А.О. Монакова^{1,2}, Г.Д. Сагарадзе²,
Н.А. Басалова², В.С. Попов^{1,2},
В.Ю. Балабаньян^{1,2}, А.Ю. 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

e-mail: monakova-anya@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, секретом, M2 макрофаги, сперматогенез, бесплодие.

Идиопатическое мужское бесплодие относится к состояниям с неудовлетворённой медицинской потребностью, для которой практически не существует эффективных методов лечения. Среди новых перспективных подходов терапии этого заболевания нами исследуется секретом мезенхимных стволовых клеток (МСК), эффективность которого была ранее продемонстрирована на различных животных моделях. Однако для продвижения в клинику препаратов на основе секретомы МСК требуются дальнейший поиск их основных клеточных мишеней и исследование механизмов действия. Ранее мы показали, что секретом МСК оказывает воздействие на различные клетки ниши сперматогонимальных стволовых клеток, стимулируя восстановление ниши после повреждения. В данной работе в качестве клеточной мишени секретомы МСК мы рассматриваем M2 макрофаги, поскольку изменение их количества и функции может играть решающую роль в патогенезе нарушений сперматогенеза. Кроме того, в составе секретомы МСК содержится множество факторов, которые способны регулировать функции макрофагов.

Чтобы проверить нашу гипотезу, мы использовали две модели нарушения сперматогенеза у животных: доксорубицин-индуцированное повреждение у мышей и абдоминальный крипторхизм у крыс. Затем мы выделили семенники интактных животных, животных с нарушенным сперматогенезом и животных, которым проводили инъекции секрета МСК под белочную оболочку яичка после повреждения сперматогенеза. Методом иммуногистохимического анализа мы оценили на срезах полученных семенников содержание клеток, экспрессирующих основные маркеры M2 макрофагов (CD163 и CD206).

По нашим и по литературным данным количество CD163+ макрофагов в семенниках крыс увеличивалось после повреждения в модели крипторхизма по сравнению с интактными животными. Инъекция секрета МСК значительно снижала количество CD163+ макрофагов. Число этих клеток также увеличивалось после повреждения сперматогенеза доксорубицином у мышей, однако значимо не уменьшалось после инъекции секрета МСК. Однако в данной модели мы выявили увеличение числа CD206+ макрофагов после повреждения и снижение их количества после введения секрета МСК.

Таким образом, локальная инъекция секрета МСК приводит к снижению инфильтрации семенников M2 макрофагами, вызванной повреждением сперматогенеза. Дальнейшее изучение общих и частных механизмов действия секрета МСК необходимо для будущих фармацевтических разработок. Исследование выполнено в рамках государственного задания МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова (эксперименты *in vivo*) и при поддержке Российского научного фонда (проект 19-75-30007, гистологические исследования).

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ПСИХИАТРИИ И НЕВРОЛОГИИ

**Я.В. Морозова¹, С.И. Рябов¹, С.М. Радаев²,
В.А. Смирнов², А.А. Гринь², Д.А. Емелина³,
Ж.Б. Семенова⁴, А.Б. Смулевич⁵**

¹ ФГБУ НМИЦ кардиологии им. академика
Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

² ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
ДЗМ, Москва, Россия;

³ ФГБУ НМИЦ психиатрии и неврологии
им. В.М. Бехтерева Минздрава России, Санкт-
Петербург, Россия;

⁴ НИИ неотложной детской хирургии и травматологии
ДЗМ, Москва, Россия;

⁵ ФГБНУ Научный центр психического здоровья
Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: yanamorozovaO@gmail.com

Ключевые слова: аутизм, шизофрения, детский церебральный паралич, посттравматическая энцефалопатия, черепно-мозговая травма, клетки пуповинной крови, восстановление когнитивных и двигательных функций.

Выполнен пул пилотных клинических исследований эффективности применения клеток пуповинной крови (КПК) в лечении ряда неврологических и психиатрических заболеваний у больных разных возрастных групп.

Применялась единая методика лечения — 4-кратное с интервалами в 14 дней внутривенное введение КПК в разовой дозе 250 млн клеток. Все этапы обработки КПК производились в соответствии с протоколом Netcord. Больным контрольных групп проводилась стандартная терапия.

Результаты. Во всех исследованиях применение КПК характеризовалось хорошей переносимостью и отсутствием значимых побочных явлений.

Аутизм: отмечено улучшение когнитивных функций и снижение выраженности аутистических симптомов у детей в возрасте до 12 лет. Выявлена положительная динамика в виде развития восприятия, снижения соматосенсорных нарушений, нормализации эмоционального статуса, развития социализации и коммуникативных способностей. Выраженность положительной динамики в группе клеточной терапии группы была значимо больше, чем у больных контрольной группы.

Шизофрения: в 6-летней серии наблюдений регистрировалось стойкое улучшение когнитивных функций и социального интеллекта, снижение выраженности расстройств астенического круга, что привело к увеличению продолжительности ремиссии и снижению частоты обращения за психиатрической помощью. Удалось преодолеть терапевтическую резистентность у хронических больных. Методом fMPT были выявлены статистически значимые зона деактивации вербальной рабочей памяти в левой лимбической доле и зона активации краткосрочной памяти в левой нижней теменной извилине.

Посттравматическая энцефалопатия у взрослых: выявлено ускорение регресса очаговой симптоматики, восстановление регуляторной функции нервной системы. По данным нейрофизиологического исследования (вызванные когнитивные потенциалы) визуализированы изменения в структурах лимбической системы (гиппокамп и связанные с ним структуры).

Последствий тяжелой ЧМТ у детей: прослеживается стойкая положительная динамика как в восстановлении двигательных, так и когнитивных нарушений, наиболее выраженные изменения достигнуты по параметру нейродинамика психических процессов. При анализе ЗВП отмечалась положительная динамика параметров коркового ответа различной степени выраженности, сопровождающаяся улучшением показателей неспецифической зрительной афферентации.

Спастические формы ДЦП: выявлено снижение патологического мышечного тонуса конечностей, возрастание мышечной силы, снижение частоты эпилептических приступов. Было отмечено улучшение в ментальной сфере (речь, память, внимание, интеллектуальное/эмоциональное развитие). В группе больных 2–6 лет положительная динамика достигалась быстрее и чаще. У больных с отягчающей ДЦП эпилепсией частота и тяжесть приступов снизились при сохранной дозе антиконвульсантов.

РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК МИКРОГЛИИ В МОЗГЕ МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПЕКСИДАРТИНИБА ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

**Е.Ю. Москалева, А.В. Родина, А.С. Жирник,
О.Д. Смирнова, О.В. Высоцкая,
А.А. Парфёнова, Ю.П. Семочкина**

НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: moskalevaey@mail.ru

Ключевые слова: микроглия, нейровоспаление, пексидартиниб, когнитивные нарушения, регенерация, γ -облучение, головной мозг.

Клетки микроглии (МГ) в головном мозге выполняют защитные функции, распознавая и фагоцитируя патогены,

погибающие клетки и фрагменты миелина, участвуют в процессах ремоделирования и устранения ненужных синапсов, в регуляции нейрогенеза, ремоделировании сосудистой сети, оказывают нейропротективное действие и обеспечивают гомеостаз в ЦНС. Пул клеток МГ поддерживается на постоянном уровне в результате сбалансированных процессов их пролиферации под действием CSF-1 и гибели путем апоптоза. При нейродегенеративных заболеваниях разного генеза, в том числе в отдаленный период после облучения опухолей мозга, активированные клетки МГ определяют развитие длительного нейровоспаления и повреждение нейронов под действием медиаторов воспаления и непосредственного повреждения нейронов с участием системы комплемента. Одним из разрабатываемых подходов к лечению таких состояний является снижение количества клеток МГ при использовании ингибиторов рецептора CSF-1, в том числе перед облучением мозга. Цель работы — изучение степени снижения и восстановления количества клеток МГ в мозге после введения мышам ингибитора такого типа пексидартиниба (PLX3397, ПД) в сравнении с уровнем нейровоспаления в гиппокампе и состоянием когнитивных функций. ПД вводили по двум схемам: только в течение 1 недели (40 мг/кг ежедневно) перед γ -облучением головы в дозе 8 Гр (I) и перед облучением головы, а затем в отдаленный период во время развития нейровоспаления (II).

Клетки покоящейся МГ определяли в суспензии клеток мозга как популяцию CD11b⁺/CD45^{low}, а активированной — как CD11b⁺/CD45^{high} с помощью проточной цитометрии. Нейровоспаление оценивали по уровню экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, состояние когнитивных функций — с помощью тестов «распознавание нового объекта» (РНО) и «водный лабиринт Морриса» (ВЛМ).

После окончания введения ПД по схеме (I) количество клеток МГ снижалось до $14,4 \pm 2,9\%$, а спустя 2 месяца оно восстанавливалось и составляло $85,2 \pm 7,5\%$, а при схеме (II) — $75,1 \pm 6,8\%$ %. Показано более быстрое восстановление сниженного после облучения головы количества клеток МГ в случае облучения мозга после введения мышам ПД. Введение ПД приводило к снижению повышенного после облучения уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β в гиппокампе и сохранению экспрессии генов цитокинов IL-6, IL-10 и IL-4 на уровне контроля, что свидетельствует о снижении уровня нейровоспаления. Через 2 месяца после облучения головы у мышей обнаружено снижение эпизодической и пространственной памяти. Введение перед облучением ПД обеспечивало сохранение эпизодической памяти, но пространственная память оставалась сниженной. У контрольных мышей ПД не влиял на состояние эпизодической и пространственной памяти.

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ СВИНЕЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА СЕРОТИПА Olig001, КОДИРУЮЩЕГО КДНК ГЕНА АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А

А.И. Муллагулова, А.А. Шаймарданова, В.В. Соловьева, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костеников, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: aisilu.mullagulova@yandex.ru

Ключевые слова: Метахроматическая лейкодистрофия, аденоассоциированный вирус, нейродегенерация.

Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД) — аутосомно-рецессивное наследственное нейродегенеративное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления (ЛБН), которое характеризуется поражением миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС). МЛД возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А, которая приводит к нарушению двигательной функции, спастическому тетрапарезу, атаксии, судорогам, атрофии зрительного нерва и когнитивным расстройствам. Целью данной работы является создание генного препарата на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа Olig001 (AABOlig001).

В этом исследовании был создан AABOlig001-ARSA, который содержит уникальную кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность гена ARSA. Полученный AABOlig001-ARSA вводили интратекально ($1,45 \times 10^{12}$ геномных копий/кг) двум мини-свиньям. Результаты сравнивали с группой интактных животных. Ферментативную активность ARSA в динамике анализировали в спинномозговой жидкости (СМЖ) и в образцах плазмы. Органы центральной нервной системы (ЦНС) использовали для анализа экспрессии ARSA с использованием количественной ПЦР и иммуногистохимии (ИГХ). Ферментативную активность ARSA в лизатах клеток, плазме, СМЖ в гомогенате органов ЦНС животных анализировали с помощью pNCS (#N7251, SIGMA). ИГХ проводили с использованием моноклональных антител к ARSA (#MAG619HU21, Cloud-Clone Corp).

Обнаружено повышение активности ARSA в плазме и СМЖ на 14–28 сутки. С помощью кПЦР подтвердили наличие мРНК ARSA в ЦНС. ИГХ анализ показал экспрессию белка ARSA в ЦНС.

Таким образом, мы показали, что после интратекального введения AABOlig001-ARSA достигает ЦНС и приводит к сверхэкспрессии ARSA. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

ПЛАЗМЕННОЕ ЭЛЕКТРОЛИТИЧЕСКОЕ ОКСИДИРОВАНИЕ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

А.А. Мураев¹, А.И. Мурзабеков², Е.А. Орлов³, Ю.В. Тарасов³

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Центр оказания медицинской помощи при стоматологических заболеваниях, ФГБУ ЦКБ с поликлиникой Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

³ ООО «Бета-Тех Медицина», Москва, Россия

e-mail: murayev_aa@pfur.ru

Ключевые слова: дентальные имплантаты, остеоинтеграция, поверхность дентального имплантата, технологии обработки поверхности, плазменное электролитическое оксидирование, микродугового оксидирование, гидроксипапатит, гидроксифосфат кальция.

Современные дентальные имплантаты обеспечивают предсказуемые долгосрочные результаты

протезирования и прочно вошли в повседневную стоматологическую практику [1, 2, 3]. В настоящей работе представлены результаты исследования применения технологии плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) для модификации поверхности дентальных имплантатов из медицинского сплава титана Grade IV, изучены остеоинтегративные свойства модифицированных дентальных имплантатов.

Для исследования были изготовлены 25 дентальных имплантатов ИРИС (Москва, Россия) длиной 10 мм и диаметром 4 мм, из сплава Grade IV. Далее поверхность всех имплантатов была подвергнута модификации методом ПЭО. После чего все образцы были поштучно упакованы, в зоне ламинарного тока воздуха (с обеспечением чистоты ИСО 7), в герметичную упаковку, пронумерованы и прошли гамма-стерилизацию. Для дальнейших исследований имплантаты были распределены генератором случайных чисел. У 5 имплантатов поверхность была изучена на сканирующем электронном микроскопе «Hitachi FlexSem1000 II» и энергодисперсионном рентгеновском спектрометре «Bruker Quantax 80», с автоматическим получение спектра элементов. У 10 имплантатов была изучена микротвёрдость поверхности по Виккерсу (наноинтендометр NanoTest 600 Platform 3). Оставшиеся 10 имплантатов были установлены экспериментальным животным, овцам, на нижней челюсти по стандартному хирургическому протоколу. Через 2, 4 и 8 недель, был проведён забор материала и проведена микрокомпьютерная томография (Bruker-microCT, Бельгия). Контролем в исследовании выступали фрезерованные имплантаты с гладкой необработанной поверхностью.

У образцов после модификации поверхности методом ПЭО формируется высокоразвитая поверхность с микропорами 1,5 мкм, площадь поверхности увеличивается в 2,7 раз. Атомный состав поверхности P-2,53%, C-1,88%, Ca-4,0%, O-49,58, Ti -41,66%. Микротвёрдость поверхности гладкой поверхности составила 280 HV, модифицированной поверхности — 400–800 HV.

После операции дентальной имплантации раны у всех животных заживали первичным натяжением. По данным микро-КТ вновь образованный объём костной ткани вокруг имплантатов составил: на 15 сутки — вокруг гладкого имплантата 42,7%, имплантат с ПЭО 43,9%; на 30 сутки — вокруг гладкого имплантата 20%, имплантат с ПЭО 40%; на 60 сутки — вокруг гладкого имплантата 30,9%, имплантат с ПЭО 49,8%.

Таким образом, проведённые *in vitro* и *in vivo* исследования свидетельствуют о том, что ПЭО является перспективным методом обработки для дентальных имплантатов, поверхность обладает высокой прочностью, чистотой и остеоинтегративным потенциалом. Выражаем благодарности компании Бета-Тех Медицина (Сколково, Россия, btmed.ru) за проведение модификации поверхности образцов дентальных имплантатов для исследования и компании ООО «НПК ЛИКОСТОМ» (Россия, iris.dental) за финансирование технических работ и самих исследований.

Литература:

1. Muraev A.A., et al. Stomatologija (Mosk). 2016;95(1):18–20. Russian
2. Gosteva E.A., et al. Biomimetics (Basel). 2021 Oct 18;6(4):61.
3. Разбицкая, Л. Е. et al. Международная научно-практическая конференции им. Д.И. Менделеева, посвященная 90-летию профессора Р.З. Магарила: Материалы конференции, Тюмень, 25–27 ноября 2021 года

ПОСТТРАВМАТИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ СПИННОГО МОЗГА: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ МНОГОГРАННОЙ ПРОБЛЕМЫ

Я.О. Мухамедшина^{1,2}, А.А. Костенников¹, А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

e-mail: yana.k-z-n@mail.ru

Ключевые слова: регенерация, травма спинного мозга, генные и клеточные подходы.

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к стойким нарушениям чувствительной и двигательной функции нервной системы и как следствие этого к глубокой инвалидизации пострадавших. Несмотря на длительную историю исследований патогенеза нейротравм, до сих пор существуют не раскрытые вопросы и поиск новых терапевтических мишеней не закончен. В этой связи не удивительно, что в настоящее время сохраняется насущная потребность в разработке новых подходов к лечению пациентов с ТСМ, основанных на понимании молекулярных и клеточных механизмов, протекающих при данном заболевании.

В нашем докладе помимо исследований фундаментальных основ нейрорегенерации, будет раскрыт многолетний опыт применения с терапевтической целью современных генных и клеточных подходов при моделировании ТСМ на животных. Помимо оценки эффективности терапии с применением общепринятых критериев, таких как степень восстановления двигательной функции и сохранность нервной ткани, нами определены изменения реактивности глиальных клеток, а также уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих синтез специфических белков нейроглии, нейротрофических факторов и других регуляторных молекул в области ТСМ. Следует отметить, что доклинические исследования эффективности генной и клеточной терапии чаще всего проводят на мелких лабораторных животных (крысы, мыши). Такие исследования достаточно часто показывают позитивные и вдохновляющие результаты по восстановлению структуры и функций травмированной ткани. Тем не менее, далеко не всегда возможно успешно экстраполировать накопленный опыт в клинику, что связано с очевидными различиями организмов человека и мелких лабораторных животных как на уровне анатомо-физиологических характеристик, механизма развития (патогенеза) заболевания, так и фенотипических проявлений, ошибок дизайна экспериментального исследования и невозможности проведения аутологичных трансплантаций. Именно поэтому одной из задач нашей работы является выполнение исследований на крупных животных (свиньи), с оценкой возможности воспроизведение результатов, наблюдаемых на крысах.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ TIL-B В ОТНОШЕНИИ ГЛИБЛАСТОМЫ

М.С. Мызина², А.А. Нестерова³, М.А. Иванов, А.А. Калинин¹, А.А. Бочаров¹, Г.М. Юсубалиева¹

¹ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. Сеченова, Москва, Россия

³ РНИМУ им. Пирогова, Москва, Россия

e-mail: m.myzina77@mail.ru

Ключевые слова: иммунотерапия, глиобластома, инфильтрирующие опухоль В-клетки, Т-клеточный иммунитет.

На сегодняшний день иммунотерапия рака нацелена на использование противоопухолевого CD8⁺ цитотоксического Т-клеточного ответа, но все больше свидетельств, что инфильтрирующие опухоль В-клетки и плазматические клетки (именуемые В-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL-B)) играют решающую синергетическую роль в контроле опухоли [1].

TIL-B проявляют новые терапевтические возможности благодаря своему способу презентации антигена Т-клеткам; их роль в сборке и поддержании иммунологически «горячего» микроокружения опухоли с участием Т-клеток, миелоидных клеток и естественных клеток-киллеров.

Основной проблемой в изучении функций опухолевых В-лимфоцитов является их двойственность, так как В-клетки способны быстро сменяться между анти- и проопухолевым фенотипами в окружающем микроокружении. Так, В-клетки становятся иммуносупрессивными в GBM и составляют ~10% инфильтрирующих иммунных клеток [2]. Однако, есть данные, что инфильтрирующие опухоль В-клетки действительно проявляют противоопухолевый эффект при различных видах рака [3]. Их функция была связана с продукцией противоопухолевых антител [4] и активацией эффекторных Т-клеток [5].

Путем стимулирования опухолеспецифического CD8 Т-клеточного иммунитета мы изучали способность TIL- В ингибировать рост GBM при их внутривенном введении мышам с моделированной ортотопической глиобластомой.

Через 10 дней после моделирования глиомы, мышей под глубоким наркозом обезглавили, извлекли головной мозг с опухолью. По модифицированному протоколу были выделены TILs и проанализированы на специфические маркеры В-клеток (CD5+ CD20+ CD19+ CD22+ CD35+) и CD69-экспрессирующих CD8⁺ Т-клеток до и после активации. Цитофлуориметрический анализ TIL проводили с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant 10, имеющего три лазера с длинами волн 405, 488 и 635 нм. Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo (версия vX.O.7).

Выделенную субпопуляцию В-TILs размножали в специализированной среде с добавлением CD40 и IL4. На 5–7 сутки однократно вводили суспензию TIL-B в объеме 100 мкл. Противоопухолевая эффективность TIL-B оценивалась методом динамического MPT исследования смоделированной глиомы мыши, а также методом интравитальной микроскопии. Полученные результаты позволят разработать индивидуальные подходы лечения к пациентам с онкологией. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ (№ 21-74-20110) «Прижизненный анализ миграции иммунных и опухоль-ассоциированных стромальных клеток в очаг опухолей».

Литература:

1. Céline M Laumont et al. Nature Reviews Cancer 2022. V. 22. P. 414.
2. C. Lee-Chang, Aida Rashidi et al. Cancer Immunol Res D. 2019. V.7. P. 1928.
3. Peiling Tsou, Hiroyuki Katayama et al. Cancer Res O. 2016. V.76. P. 5597.
4. Soizic Garaud, Laurence Buisseret et al. JCI Insight. S. 2019. V. 4. e129641.
5. Tullia C. Bruno, Peggy J. Ebner et al. Cancer Immunol Res. O. 2017. V. 5. P. 898.

РЕАКЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТОПОГРАФИЮ ПОВЕРХНОСТИ КОМПОЗИТНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ POLY-D-L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE

С.В. Надеждин, Д.В. Маклаков, М.П. Фомина, Г.А. Новиков

ОФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

e-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, топография поверхности, адгезия, миграция, пролиферация, дифференцировка.

Топография поверхности имплантатов определяет биологические реакции клеток и скорость процесса регенерации тканей. Сегодня костнопластические материалы представляют собой композиты, состоящие как из сплавов металлов, так и полимеров обогащенных различными остеоиндуктивными факторами. Цель исследования — оценить адгезию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку МСК в остеогенном направлении при культивировании на композитных матрицах, обладающих различными физико-химическими характеристиками.

Методом мокрого формования были изготовлены композитные матрицы (KM) на основе poly-D-L-lactide-co-glycolide (PLGA — 75/25) без и с фосфатами кальция/гидроксиапатитом (PGLA+ФК/ГА).

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) крысы культивировались статическим методом на KM в лунках 24-х луночных планшетов 10 дней в питательной среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной сывороткой (ОО «ПанЭко», РФ) в стандартных условиях. Методом конфокальной лазерной микроскопии оценивали адгезию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку МСК в остеогенном направлении при помощи реагентов: «AM Calcium Green-1» (Invitrogen, США), «RUNX2», «Osterix» и «Vinculin» со вторичными антителами (Abcam, Великобритания). Статистическую обработку выполняли на ПО «Statistica» 6.0.

Методами растровой сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии было установлено, что более развитой рельеф поверхности, пористость и шероховатость поверхности имеют KM из PGLA+ ФК/ГА, по сравнению с KM из PLGA.

В ходе исследования *in vitro* было установлено, что МСК культивированные на KM из PGLA+ФК/ГА сильнее прикрепляются к поверхности и мигрируют в глубину материала, что подтверждается экспрессией винкулина. Также выявлено увеличение пролиферации и дифференцировки МСК в остеогенном направлении, которое проявляется увеличением концентрации Ca²⁺ и экспрессией факторов транскрипции RUNX2 и Osterix по сравнению с МСК культивированными на KM из PGLA.

Проведенное исследование показало, что МСК активно реагируют на топографию поверхности KM, при этом ключевыми факторами обеспечивающими остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства являются: пористо-волоконная структура материала, наноразмерная шероховатость поверхности (менее 70 нм) и наличие фосфатов кальция/гидроксиапатита. Исследование выполнено в рамках соглашения № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Н.А. Надеждина, Д.В. Маклаков, Д.А. Мовчан, М.В. Покровский, Ю.Е. Бурда

ОФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет), Белгород, Россия

e-mail: nadezhhdina.nat@yandex.ru

Ключевые слова: рекомбинантный эритропоэтин, мезенхимные стволовые клетки, пролиферация, дифференцировка.

Рекомбинантный эритропоэтин (рЭПО) широко используется в клинической практике. Однако лечение рЭПО инициирует дополнительные нежелательные эффекты, которые включают снижение костной массы, что повышает риск переломов у людей с высокими уровнями эритропоэтина [1]. Сегодня уже установлено, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) обеспечивают регенерацию костной ткани являясь источником остеобластов, которые создают костный матрикс [2]. Целью настоящего исследования явилась оценка воздействия различных концентраций рЭПО на пролиферацию и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток человека.

В работе использовали МСК человека из жировой ткани (ООО «БиолоТ», РФ), которые культивировали в питательной среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», РФ) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой в CO₂ инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, 100% влажности. МСК вносили в лунки 96 луночных планшетов, в которые добавляли рЭПО в разведении 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. В качестве исходного раствора использовали 1 мл рЭПО (Эпокрин® 2000МЕ/1мл, ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА, РФ). Оценку пролиферации МСК оценивали на 3 день с использованием реагента МТТ (Sigma-Aldrich, США), на 7 день оценивали способность спонтанной дифференцировки МСК в остеогенном направлении по экспрессии щелочной фосфатазы при помощи реагента BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich, США) с помощью фотометра (Multiskan FC, Thermo Scientific, США). Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Statistica 10.0 с использованием Т-критерия Вилкоксона.

Результаты исследования показали, что угнетение пролиферации МСК отмечается в разведении 1:10, различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,01$. Необходимо отметить, что тенденция увеличение пролиферативной активности отмечается с разведения 1:100 хотя достоверных различий с контролем не установлено. Активация дифференцировки МСК в остеогенном направлении выявлена в разведении 1:1000, по сравнению с контролем при $p \leq 0,01$, однако в разведении 1:10000 отмечается снижение экспрессии щелочной фосфатазы МСК. Таким образом, рЭПО в повышенных концентрациях угнетает пролиферацию и дифференцировку МСК в остеогенном направлении, а разведение 1:1000 является оптимальным для обеспечения остеоиндукции МСК.

Литература:

1. Kristjansdottir HL, Lewerin C, Lerner UH, et al. J Bone Miner Res. 2020. V. 35(2). P. 298–305.
2. Florencio-Silva R, Rodrigues da Silva Sasso G, Sasso-Cerri E, et al. Biomed Res Int. 2015. V. 2015. P. 1–17.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР FREUD-1 В РЕГУЛЯЦИИ АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ: РОЛЬ 5-HT_{1A} И D2 РЕЦЕПТОРОВ, А ТАКЖЕ CREB- И NF-κB-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

В.С. Науменко, Е.М. Кондаурова, Т.В. Ильчибаева, Н.К. Попова

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: naumenko2002@mail.ru

Ключевые слова: нокдаун Cc2d1a/Freud-1, 5-HT_{1A} серотониновый рецептор, D2 дофаминовый рецептор, CREB, NF-κB, мыши BTBR, аутистически-подобное поведение.

Несмотря на высокую распространенность аутизма в человеческой популяции, механизмы его возникновения в настоящее время не выяснены. В этой связи особое внимание привлекает транскрипционный фактор Freud-1 (кодируется геном Cc2d1a), который регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей и, в том числе, является сайленсером 5-HT_{1A} серотониновых и D2 дофаминовых рецепторов. Известно, что нарушение функции Freud-1 приводит к развитию различных психопатологий.

В данной работе мы обнаружили высокий уровень экспрессии гена Cc2d1a/Freud-1 в гиппокампе мышей линии BTBR, являющихся моделью аутизма, по сравнению с мышами линии C57Bl/6J и исследовали как влияет нормализация экспрессии этого гена в гиппокампе мышей BTBR на поведение, 5-HT_{1A} и D2 рецепторы, а также на внутриклеточные сигнальные пути CREB и NF-κB. Через 5 недель после введения мышам BTBR аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), несущего плазмиду pAAV_H1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP, кодирующую малую образующую шпильку PНК, подавляющую экспрессию гена Cc2d1a/Freud-1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, было обнаружено усиление тревожности и увеличение времени нахождения платформы и преодоленного расстояния до платформы в водном лабиринте Морриса, что, вероятно, связано с усилением стратегии активного избегания стресса. Нокдаун Cc2d1a/Freud-1 не повлиял на пространственную память и фосфорилирование транскрипционного фактора CREB.

Принимая во внимание полученные ранее данные о влиянии нокдауна Cc2d1a/Freud-1 на пространственную память и транскрипционный фактор CREB у «нормальных» мышей линии C57Bl/6J, можно предположить нарушение CREB-зависимого эффекторного пути у мышей BTBR, что может играть важную роль в формировании аутистически-подобного фенотипа. При этом нокдаун Cc2d1a/Freud-1 в гиппокампе мышей BTBR не повлиял ни на экспрессию 5-HT_{1A} и D2 рецепторов, ни на экспрессию ключевых генов NF-κB сигнального пути (Nfkb1 и Rela).

Полученные данные позволяют заключить, что транскрипционный фактор Freud-1 играет существенную роль в патогенезе тревожности и регуляции активного избегания стресса при аутизме. Кроме того, результаты данного исследования позволяют предположить нарушение CREB-зависимого сигнального пути в гиппокампе мышей линии BTBR. Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом #FWNR-2022-0023. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-15-00028.

КОЛЛАГЕНЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ В КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

Ю.А. Нащечкина, М.С. Сироткина, Н.А. Михайлова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Ключевые слова: коллагены I, IV, V типов, кислотная и ферментативная экстракция, коллагеновые носители для культивирования клеток.

Роль внеклеточного матрикса для решения актуальных задач клеточной терапии и регенеративной медицины сложно переоценить. Выделенные из тканей клетки, даже на ранних пассажах культивирования на культуральном пластике, существенно меняют свои функциональные свойства и фенотип. Такие изменения, прежде всего, обусловлены потерей естественного клеточного окружения при переводе клеток из нативной ткани в условия *in vitro*, в связи с чем, воссоздание естественного микроокружения клеток *in vitro* является важной задачей современной клеточной биологии и регенеративной медицины.

Коллаген является преобладающим компонентом внеклеточного матрикса и выполняет не только структурную, но и функциональную роль в соединительной ткани. На сегодняшний день известно около 30 различных типов коллагенов, которые обнаружены практически во всех видах соединительной ткани, где они выполняют конкретные функции. В зависимости от типа клеток, выделенных из определенной ткани, требуется создать носитель на основе коллагена соответствующего типа или сочетания коллагенов разных типов. Являясь фибриллообразующим, коллаген I типа входит в состав покровных тканей в виде композитных структур с коллагеном IV типа, а в роговице — с коллагеном V типа.

Целью данной работы было выделение коллагенов трех типов и разработка на их основе носителей, воспроизводящих нативную структуру клеточного матрикса покровных тканей и роговицы, и предназначенных для культивирования и трансплантации клеток.

Коллаген I типа был экстрагирован методом кислотной экстракции из сухожилий крысиных хвостов, коллагены IV и V типов получены методом ферментативной экстракции из плаценты человека. Все белки были охарактеризованы методом иммуноблоттинга и ИК-Фурье спектроскопии. Показано, что степень чистоты получаемых коллагенов превышает 99%. На основе коллагенов трех типов были сформированы композитные носители в виде пленок и гелей. Структуру полученных субстратов анализировали с помощью методов атомно-силовой, сканирующей электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии. В результате работы получены субстраты на основе фибриллярных структур коллагена. При анализе композитных структур на основе коллагенов I и IV типов, а также I и V типов показано, что способность коллагена I типа формировать *in vitro* нативные фибриллы в присутствии коллагенов других типов не теряется. В то же время, при добавлении к коллагену I типа коллагена V типа, диаметр фибрилл уменьшается, что согласуется с опубликованными ранее данными по исследованию нативной роговицы.

На полученных субстратах культивировали клетки мезенхимного и эпителиального происхождения. Методом МТТ анализа и флуоресцентной микроскопии продемонстрированы не только отсутствие цитотоксичности, но и высокий адгезивный и пролиферативный потенциал клеток, культивируемых на композитных коллагеновых субстратах. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-03-00400 А.

IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ФИБРИНА

И.А. Недорубова¹, В.О. Мокроусова^{1,2},
А.Ю. Меглей², В.П. Басина³,
Т.Б. Бухарова¹, Д.В. Гольдштейн¹

¹ ФГБНУ Медико-генетический научный центр
им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ ЦНИИСиЧЛХ Минздрава России,
Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава
России, Москва, Россия

e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Ключевые слова: ген-активированные матриксы, плазмидная ДНК, BMP-2, коллаген, PRP.

В настоящее время в регенеративной медицине для замещения дефектов костной ткани особенно актуальна разработка биосовместимых биорезорбируемых матриксов, содержащих плазмидные конструкции с генами остеоиндукторов. Цель данной работы — *in vitro* исследование свойств ген-активированных матриксов на основе коллагена и фибрина, импрегнированных полиплексами с геном костного морфогенетического белка 2 (BMP2).

Материалы и методы. Были сформированы матриксы, состоящие из гидрогелей коллагена I типа и фибрина, полученного на основе обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet Rich Plasma, PRP), в соотношении 1:2 по объемным долям. Исследование проводили на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани крыс. Цитотоксичность матриксов исследовали в течение 7 суток методом МТТ-теста и с помощью флуоресцентной микроскопии: все клетки были окрашены РКН-26, живые клетки окрашивались кальцеином AM, а мертвые клетки — DAPI. В качестве трансфицирующего агента для формирования полиплексов использовали Turbofect. Эффективность трансфекции при использовании матриксов, импрегнированных полиплексами с геном усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), оценивали по наличию клеток, содержащих флуоресцентный белок GFP, их количество определяли методом проточной цитофлуориметрии в течение 14 суток. Уровень трансфекции при использовании полиплексов с геном BMP2, оценивали по уровню экспрессии данного гена методом ПЦР-РВ и наличию белка BMP-2 с помощью иммуноферментного анализа. Для оценки остеогенных свойств этих матриксов проводили окрашивание ализариновым красным минерализованного внеклеточного матрикса (ВКМ).

Результаты. Показано, что полученные матриксы на основе коллагена и PRP обладают высокой цитосовместимостью. Кроме того, входящие в состав PRP ростовые факторы способствуют лучшему делению клеток, и через 7 суток относительная жизнеспособность клеток в присутствии матриксов составляла $153,2 \pm 16,6\%$ по сравнению с контролем. Показано, что полиплексы с геном EGFP высвобождаются из матрикса и эффективно трансфицируют клетки на протяжении 14 суток. Культивирование ММСК в присутствии ген-активированных матриксов, импрегнированных полиплексами с геном BMP2, через 21 сутки приводит к увеличению экспрессии гена BMP2 в 2727 ± 84 раз, повышению продукции белка BMP-2 в $24,5 \pm 0,3$ раза по сравнению с контролем, а также к усилению минерализации ВКМ.

Разработанные ген-активированные матриксы на основе коллагена и PRP, импрегнированные полиплексами с геном *BMP2*, обладают высокой цитосовместимостью, обеспечивают высокий уровень трансфекции культур ММСК и оказывают остеоиндуктивное действие *in vitro*, что позволяет рассматривать данные матриксы как перспективный материал для регенерации костной ткани. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

ВЛИЯНИЕ ТРИПЕПТИДА PRO-GLY-PRO НА РЕГЕНЕРАЦИЮ НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ IN VITRO

А.А. Некрасова¹, А.Е. Згодова¹, М.М. Гончаров², В.Г. Пинелис¹, С.Е. Бадмаева³, З.В. Бакаева^{1,3}

¹ НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, Элиста, Россия

e-mail: nekrasovanas@gmail.com

Ключевые слова: первичная нейроглиальная культура, черепно-мозговая травма, глутаматная эксайтотоксичность, отсроченная кальциевая дисрегуляция, митохондриальный потенциал, Pro-Gly-Pro, нейропротекторный эффект.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является ведущей причиной смерти и инвалидности в детском возрасте. В среднем число случаев ЧМТ составляет 0,3% численности детской популяции и сопровождается высоким уровнем смертности [1]. Исходя из патогенеза развития ЧМТ, активные вещества, действующие сразу после развития патологических процессов и способные влиять на несколько механизмов клеточной защиты, оставаясь при этом безвредными на системном уровне, имеют терапевтический потенциал для снижения объемов повреждения вследствие ЧМТ.

Ранее нами была разработана модель механической нейротравмы *in vitro* [2], позволяющая посредством одновременного измерения динамики $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ отслеживать как острые, так и отставленные во времени эффекты механической травмы. Экспериментальная модель основана на том, что травма мозга сопровождается глутаматной эксайтотоксичностью, нарушением кальциевого гомеостаза и митохондриального потенциала.

Было показано, что эндогенный трипептид Pro-Gly-Pro (PGP), в экспериментах на первичной нейроглиальной культуре [3] уменьшает нарушение кальциевого гомеостаза и оказывает нейропротекторный эффект в условиях глутаматной эксайтотоксичности.

В данной работе мы исследовали влияние PGP на выживаемость нейронов и изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ клеток первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга после механического нарушения ее целостности *in vitro*.

Результаты показали, что при длительном воздействии на клеточную культуру PGP (10 μM в течение 7 дней) увеличивает lag-период развития отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД), способствует более быстрому наступлению реполяризации митохондрий и восстановлению исходно низких значений $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах после воздействия субтоксических (33 μM) и токсических доз Glu (100 μM). Другим аспектом его пролонгированного влияния на травмированные культуры

является увеличение выживаемости клеток, а также усиление их способности к миграции в поврежденную область. При однократном введении PGP (10 μM) снижает амплитуду флуктуаций $[Ca^{2+}]_i$, индуцируемых механической травмой.

Таким образом, PGP, предотвращая развитие кальциевой дисрегуляции и митохондриальной дисфункции, защищает нейроны от гибели, вызванной механической травмой в модели *in vitro*. Полученные данные указывают на перспективность его использования для ограничения патологических процессов в посттравматический период. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минздрава России, проект № ААААА19-119012590191-3, грантов Минобрнауки России, № ФГФУ-2022-0012.

Литература:

1. Сабиров Д.М., Росстальная А.П., Махмудов М.А. Вестник экстренной медицины. 2019. № 2.
2. Bakaeva Z.V., Surin A.M., Pinelis V.G. et al. Dokl. Biochem. Biophys. 2020. V. 491(1).
3. Bakaeva Z., Goncharov M., Krasilnikova I. et al. Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 3858.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ NOD-1, TLR8, ZBP-1, RIG-1 В МИОМЕТРИИ ПРИ ПРЕЗКЛАМПСИИ

Н.В. Низяева¹, Э.Ю. Амирасланов², К.А. Артемьева¹, И.А. Степанова¹, М.В. Шамаракова³, Н.Б. Тихонова¹

¹ НИИМЧ им. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, Москва, Россия

³ Центр Планирования семьи и Репродукции (ЦПСИР), Москва, Россия

e-mail: sunset_whitch@mail.ru

Ключевые слова: презекламписия, миометрий, паттерн-распознающие рецепторы.

Патогенез ПЭ связывают с неполноценностью трофобласта и недостаточной трансформацией спиральных артерий [1]. Экспрессия паттерн-распознающих рецепторов (ПРР) в миометрии при ПЭ практически не изучена.

Работа выполнена на образцах миометрии 22 женщин 18–43 лет, на сроке 27–39 недель гестации. У 12 пациенток диагностировали ПЭ (6 — тяжелое течение, 6 — умеренное), группу контроля составили 10 женщин с несложившейся доношенной беременностью. Этическая экспертиза: протокол заседания комитета по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦАГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России № 6 от 09.06.2016. Все женщины подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Фрагменты миометрии размерами 1×0,5–0,7×0,3 см получали во время кесарева сечения с передней стенки матки. На парафиновых срезах выполняли иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с применением антител (АТ) к TLR (Toll-like receptor) 8, NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein)-1, RIG (retinoic acid-inducible gene)-1, ZBP (zip-code-binding protein)-1. Интенсивность ИГХ окрашивания оценивали в единицах оптической плотности с помощью микроскопа Nikon Eclipse (x400) и программного обеспечения NIS-Elements

(Czech Republic). Данные анализировали в программе Sigmapstat 3.5.

У пациенток группы контроля выявили умеренную экспрессию ПРР в структурах миометрия, эндотелии сосудов и ФБК. При ПЭ отмечали чередование участков с выраженным окрашиванием и его потерей. Выявили снижение окрашивания NOD1 и RIG1 в миометрии и ФБК, особенно при тяжелой ПЭ ($p < 0,05$), тенденцию к снижению в эндотелии ($p < 0,1$). Отмечали тенденцию к усилению окрашивания в миометрии ZBP1 и TLR8 ($p < 0,1$), в ФБК и эндотелии — значимое усиление окрашивания ZBP1 ($p < 0,05$). Т.о., нарушение экспрессии ПРР при ПЭ в структурах миометрия, показывает, что при этой патологии изменяются как инвазивные свойства трофобласта, так и характеристики миометрия, что демонстрирует его важную роль в патогенезе ПЭ. Работа выполнена в рамках темы ГЗ № ЕГИСУ НИОКТР — 122030200534-4

Литература:

1. Dong X., Gou W., Li C., et al. *Pregnancy Hypertens.* 2017. N 8. P. 60–64.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПТГ-ЗАВИСИМОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ПОСТНАТАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

М.Ю. Николаев¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, Д.А. Найда³, М.В. Воронцова²

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: ЗГлавный клинический военный госпиталь им. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия mikhail.nikolaev01@bk.ru

Ключевые слова: кальциевая сигнализация, МСК, паратгормон, ингибиторный анализ.

Ранее в нашем коллективе была выявлена гетерогенность кальциевых ответов при воздействии паратгормона у популяций мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани и надкостницы. Проведение разделенного вида кальциевого ответа соотносится с различиями в последующей дифференцировке клеток. В МСК, выделенных из жира живота, регистрируется плавное повышение уровня внутриклеточного кальция, паратгормон влияет на клетки проостеогенно. Культуры МСК, выделенные из надкостницы, в ответ на действие паратгормона отвечают преимущественно осциллирующими кальциевыми ответами, и остеогенная дифференцировка подавляется. При активации основного рецептора паратгормона ПТГР1 запускаются по меньшей мере два сигнальных пути: Gq/фосфолипаза C/кальций и Gs/аденилатциклаза/цАМФ. В данной работе был проведен ингибиторный анализ сигнальных путей ПТГР1 для выяснения молекулярных механизмов формирования различных сигнальных ответов при действии на клетки ПТГ [1,2].

Из полученных данных можно сделать вывод, что осциллирующие всплески кальция зависят от базального уровня внутриклеточного кальция. При его снижении, путем блокирования поступления ионов из лизосомальных источников и каналов L-типа, кальция недостаточно в цитоплазме для запуска осцилляций. Плавный прирост

может быть обусловлен притоком кальция из саркоплазматического ретикулама через рианодин-чувствительные каналы. Это подтверждается уменьшением ответов данного типа при использовании рианодина, и их увеличением при нарушении механизмов кратковременных кальциевых ответов. Так блокатор кальциевых каналов L-типа несколько снижает базальный уровень внутриклеточного кальция, которого становится недостаточно для запуска пикового ответа, но, по-видимому, достаточно для открытия кальций-зависимых рианодин-чувствительных каналов. Во всех типах кальциевых ответов задействованы ИЗФР, так как при использовании блокатора ИЗФР (2APB) изменение уровня кальция в цитоплазме перестало наблюдаться. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-75-30007.

Литература:

1. Kotova P.D. и др. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Res.* 2014. Т. 1843. № 9. С. 1899–1908.
2. Воронцова М.В. и др. *Гены и клетки.* 2019. Т. 14. С. 57.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Н.А. Николаева^{1,2,3}, В.В. Розанов^{1,2,3}, И.В. Матвейчук³, А.П. Черняев^{1,2}

¹ Северо-Восточный Федеральный Университет им.М.К. Аммосова, Якутск, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБНУ Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

e-mail: larsoon696@mail.ru

Ключевые слова: костные имплантаты, комбинированная стерилизация, радиационная обработка, озоновое воздействие, биоимплантология.

Общим недостатком большинства известных методов стерилизации костных имплантатов является высокая вероятность побочных эффектов, связанных с химическими, термическими и другими воздействиями и проявляющихся в изменении структуры, морфомеханических параметров и характеристик, а также нарушении остеиндуктивных свойств образца [1].

При стандартных для радиационной стерилизации дозах облучения (25 кГр), и даже при более щадящих дозах (15 кГр), пучок ускоренных электронов деминерализует и вызывает пористость образцов, что приводит к снижению эффективности свойств биоимплантатов [2], подтверждает необходимость уменьшения дозы облучения при сохранении эффективности стерилизации. Результаты исследования указывают на эффективность предложенной ранее методики комбинированной двухэтапной обработки костных биоимплантатов с использованием озоновой стерилизации на первом этапе и воздействием ионизирующего излучения на втором этапе, позволяющей достичь стерилизующего эффекта при величине поглощенной дозы 11–12 кГр [3].

С помощью ИК-спектроскопии, растровой электронной и атомно-силовой микроскопии проведен сравнительный анализ влияния озонового воздействия на образцы на первом этапе обработки. Показано, что в выбранном диапазоне параметров такое воздействие не приводит к морфологическим изменениям поверхности образца, но существенно изменяет элементный состав [4]. В частности, отмечен рост

содержания кислорода в поверхностных слоях костного образца. Дополнительные данные о белковых и минеральных компонентах костной ткани дает анализ ИК-спектров. Полученные результаты позволяют уточнить информацию о состоянии поверхностного слоя костных имплантатов. Работа выполнена в рамках государственного задания FGUU-2022-0008-122022600100-2 и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Литература:

1. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Пантелеев В.И. и др. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013, Т. 11, № 11, с. 92–97.
2. Шангина О.Р., Нигматуллин Р.Т. Морфология. 2006. Т. 129. № 3. с. 44.
3. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К. и др. Патент РФ № 2630464 от 08.09.2017, Бюл. № 25 с. 3.
4. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. Известия РАН. Серия физическая, 2020, том 84, № 11, с. 1589–159.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТАРГЕТНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ RGD И GHK С ГЕПАРИНОМ

В.А. Николаева, М.И. Камалов, В.В. Часов, Т.И. Абдуллин, К. Даиоб, М. Зухайб

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: nikolviktorii@gmail.com

Ключевые слова: липосомы, таргетная система доставки, RGD, GHK, гепарин.

Таргетные олигопептиды являются перспективными лигандами для разработки систем доставки лекарств. Ранее нами было показано, что пептидный аналог факторов роста GHK значительно усиливает клеточно-проникающий эффект интегрин-специфичного пептида RGD [1]. Актуальной задачей для выяснения механизмов этого эффекта является изучение взаимодействия пептидов с потенциальными клеточными мишенями, такими как гликозаминогликаны. Целью настоящей работы явилось изучение взаимодействий пептидов RGD и GHK с гепарином в качестве модельного гликозаминогликана и влияния этих взаимодействий на коллоидные и клеточно-проникающие свойства липосом.

L-аргинил-глицил-L-аспарагиновую кислоту (RGD) и глицил-L-гистидил-L-лизин (GHK) и их конъюгаты с лауриновой кислотой получали методом твердофазного синтеза. Использовали моноламеллярные липосомы на основе фосфатидилхолина, которые получали путем гидратации тонкой пленки и модифицировали пептидами RGD и GHK.

Взаимодействие гепарина с пептид-модифицированными липосомами характеризовали методом динамического рассеяния света. Титрование GHK-модифицированных липосом гепарином сопровождалось дозозависимым повышением анионного заряда системы до $-35 \pm 0,75$ мВ. В тех же условиях коллоидные свойства RGD-липосом достоверно не изменялись. Дополнительно взаимодействие пептидов с гепарином оценено методом изотермической титрационной микрокалориметрии, подтвердившим специфическое связывание GHK с гепарином. Методом проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии оценен

модулирующий эффект гепарина на клеточно-проникающие свойства пептид-модифицированных липосом и распределение инкапсулированного флуоресцентного красителя в клетках млекопитающих.

Полученные результаты представляют интерес для создания улучшенных систем доставки лекарств на основе липосом, модифицированных таргетными компонентами. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-73-10105 и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

Литература:

1. Zoughaib M., Pavlov R., Gaynanova G. et al. Materials Advances. 2021. V. 2. P. 7715.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ РАССЛОЕНИИ АОРТЫ

О.В. Никуленкова¹, А.Е. Крупнин¹, Д.Г. Брешенков², Э.Р. Чарчян²

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБНУ РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: orbisthedeer@yandex.ru

Ключевые слова: расслоение аорты, ремоделирование аорты, вычислительная гидродинамика, неньютоновская жидкость, модель Каро-Яшида, пристеночные сдвиговые напряжения.

Расслоение аорты является одной из наиболее тяжелой и распространенной патологией сердечно-сосудистой системы. Протяженность патологии требует обширных реконструктивных вмешательств, а замена всей расслоенной аорты имеет высокую травматичность, что не позволяет рекомендовать данный вид реконструкций во всех случаях. Основным методом своевременной профилактики осложнений и выставления показаний к хирургическому лечению является геометрический морфологический анализ (ГМА) состояния различных сегментов аорты с течением времени [1]. Перспективным направлением является применение методов вычислительной гидродинамики (computational fluid dynamics — CFD) при изучении механизмов ремоделирования аорты и внутриаортальной гемодинамики, что позволит прогнозировать развитие отрицательного ремоделирования в отдаленном периоде наблюдения и предупредить осложнения.

В данной работе проведено численное исследование внутриаортальной гемодинамики при расслоении. Нестационарная задача течения крови решена как для ламинарного, так и для турбулентного режимов (использована модель shear stress transport — SST). Кровь представлена как неньютоновская несжимаемая жидкость, динамическая вязкость которой описывается моделью Каро-Яшида. Построены поля скоростей и давлений в истинном и ложном каналах, а также в областях фенестраций, выявлены зоны стагнации и рециркуляции крови, проведена количественная и качественная оценка пристеночных сдвиговых напряжений (wall shear stresses — WSS), проведено сравнение результатов при ламинарном и турбулентном режимах течения крови в течение сердечного цикла.

Литература:

1. Чарчян Э.Р., Абугов С.А., Хачатрян Э.Р. и др. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019. № 5. С. 6.

САМООРГАНИЗАЦИЯ ПУТЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ КОНДЕНСАЦИИ В КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТАХ ОПРЕДЕЛЯЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНУЮ СУДЬБУ МСК

**П.П. Нимирицкий, Е.С. Новоселецкая,
Р.Ю. Еремичев, Н.А. Александрушкина,
Н.А. Басалова, П.И. Макаревич**

*Институт Регенеративной Медицины,
Медицинский научно-образовательный центр, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

e-mail: nimiritsky@gmail.com

Ключевые слова: самоорганизация, стромальные клетки, мезенхимальная конденсация, МСК, остеогенез.

Важнейшей целью регенеративной медицины является восстановление микроархитектуры тканей как структурированных в пространстве клеточных сообществ. Формирование структуры тканей в онтогенезе задействует естественные механизмы самоорганизации клеток при их локальных взаимодействиях [1]. Для клеток мезенхимного ряда характерна самоорганизация путем конденсации, имеющая ключевое значение при органогенезе многих органов (кости, почки, зубы, мышцы и т. д.). Конденсация клеток опосредована их дифференциальной межклеточной адгезией, специфической миграцией, перестройками цитоскелета. Механизмы и роль спонтанной (без экзогенных воздействий) самоорганизации мультипотентных стромальных клеток (МСК) были исследованы в модели клеточных пластов (КП) [2].

Было показано, что самоорганизация приводит к формированию неоднородной в пространстве плотности клеточного состава, обеспечивает структурированное распределение клеток с разными свойствами, особенностями профиля транскрипции, метаболическими характеристиками. Более того, конденсация МСК при самоорганизации определяет их преобладающий тип дифференцировки. Было обнаружено, что конденсация МСК повышала эффективность их дифференцировки в остеогенном и хондрогенном, но не адипогенном направлениях. С использованием метода лазерной микродиссекции были препаративно выделены клетки, различные по степени вовлеченности в процесс конденсации. Далее, с помощью секвенирования РНК были установлены последствия конденсации на паттерн экспрессии генов, что позволило изучить эффекты компактизации и предположить её механизмы. Анализ показал, что клетки после конденсации имеют черты дифференцировки в остеогенном направлении: локальная активность щелочной фосфатазы, обогащенный коллагеном 1 типа внеклеточный матрикс, характерные черты метаболизма и др. Транскрипционные сдвиги при конденсации также включали активацию участников сигнального пути ГТФаз Rho, и подавление активности транскрипционного фактора SREBP — ключевого для адипогенеза. С использованием ингибиторного анализа было показано, что самоорганизация МСК в КП протекает путем Rho-зависимой конденсации, и активность сигнального пути Rho определяет формирование в изначально гомогенном конструкте пространственной гетерогенности клеток. Конденсация МСК в клеточных пластах может рассматриваться как модель самоорганизации клеток при восстановлении микроархитектуры тканей и органов после повреждения. Работа была выполнена в рамках государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития

Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология»

Литература:

1. Nimiritsky P.P. et al. International journal of molecular sciences. — 2019. — Т. 20. — №. 4. — С. 823.
2. Nimiritsky P. et al. Biomedicines. — 2021. — Т. 9. — №. 9. — С. 1192.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КОЖИ И ДИНАМИКУ ПОПУЛЯЦИИ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Ю.А. Новикова¹, О.С. Роговая², А.Н. Попова²,
А.Д. Фиошин², Е.А. Воротеляк²**

*¹ Российский Химико-Технологический Университет
им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

*² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия*

e-mail: yula1308@mail.ru

Ключевые слова: кератиноциты, криохранение, эпидермальные стволовые клетки, апоптоз.

Криохранение кератиноцитов человека позволяет планировать научные эксперименты и операции по трансплантации тканеинженерных конструкций на основе кератиноцитов, а также является важным этапом в сохранении и пополнении клеточных банков. Замораживание кератиноцитов в суспензии стимулирует процессы апоптоза и терминальной дифференцировки, что приводит к массивной потере пула стволовых и прогениторных кератиноцитов и ограничивает возможность их использования после размораживания.

Цель нашей работы: исследовать структуру и динамику гибели кератиноцитов и проследить восстановление популяции эпидермальных стволовых клеток после криоконсервации.

Кератиноциты замораживали по разработанному ранее протоколу замораживания суспензии кератиноцитов на базе Коллекции клеточных культур ИБР РАН и размораживали по истечению как минимум 2 недель нахождения в условиях глубокой заморозки.

Методом проточной цитометрии проводили анализ на определение количества апоптотических клеток до и после криохранения. Выяснили, что до криохранения количество клеток в позднем апоптозе составляет около 20%, сразу после размораживания увеличивается до 42%, а к 7 суткам снижается до 27%.

Иммунофлуоресцентным методом выявили доли пролиферирующих клеток с помощью антител к ki67 и доли стволовых и ранних прогениторных клеток с помощью антител к р63 в динамике роста первичной культуры и культуры после криохранения. Максимальную долю ki67-положительных клеток наблюдали на 3 сутки после посева на пластик (73% до криохранения и 81% после криохранения), к 7 суткам пролиферация снижалась в обоих случаях (35% и 45%). Доля р63-положительных клеток увеличивалась к 3 суткам культивирования (89% и 82%) и оставалась высокой к 7 суткам (86% и 84%).

Методом Вестерн-Блот анализа исследовали уровень экспрессии сигнального белка phospho-YAP и β4-интегрин, специфического для стволовых клеток. Уровень ITG β4 значительно снижался в клетках сразу после разморозки, оставался низким на 1 сутки культивирования после размораживания, но восстанавливался

к 7 суткам. Уровень экспрессии Р-УАР до криоконсервации, сразу после размораживания, на 1 и 7 сутки культивирования после криоконсервации менялся незначительно.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что пул стволовых клеток в популяции эпидермальных кератиноцитов после криохранения заметно снижается, но полностью восстанавливается к 7 суткам культивирования после размораживания.

МАТРИКСЫ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ СПИДРОИНОВ ПОДДЕРЖИВАЮТ РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

**Е.В. Новосадова¹, И.А. Гривенников¹,
Д.М. Шимченко¹, С.А. Антонов¹,
Т.П. Герасимова¹, Л.В. Новосадова¹,
Е.Л. Арсеньева¹, Л.И. Давыдова²,
К.В. Сидорук², В.Г. Богуш², В.З. Тарантул¹**

¹ Институт молекулярной генетики НИЦ
Курчатовский институт, Москва, Россия
² НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: novek-img@mail.ru

Ключевые слова: рекомбинантные спидроины, матриксы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, направленная дифференцировка, нейроны.

Разработка новых биоматериалов и усовершенствование современных методов биоинженерии дали возможность культивировать клетки на 3D подложках-носителях естественного или искусственного происхождения. Выбор матриксов — первый этап для формирования подобного рода систем. Матриксы должны соответствовать определенным требованиям: отсутствие цитотоксичности, хорошая адгезионность, обеспечение, либо препятствие дифференцировки клеток, отсутствие иммунного ответа, биорезорбируемость. Нейрогенез происходит в динамически меняющейся среде, где межклеточные взаимодействия и локальные сигналы, в том числе от соседних клеток, гуморальные факторы и внеклеточный матрикс регулируют дифференцировку и гомеостаз клеток [1]. От того, насколько точно и правильно удастся воссоздать этот сложный массив разнообразных сигналов, будет зависеть пространственная организация клеток, правильное формирование контактов и зрелость получаемых культур. В процессах нейродегенерации принимают участие не только специфические нейроны, но и клетки глии, поэтому при выборе матрикса важно, чтобы он обеспечивал подходящую среду.

Рекомбинантные спидроины (РС) по своим свойствам оптимально подходят для разработки таких матриксов. Благодаря своей способности к самосборке, они могут образовывать различные надмолекулярные структуры, такие как гидрогели, в том числе микрогели, прозрачные упругие пленки, высокопористые губчатые 3D-скаффолды и т.п. Учитывая такие свойства биоматериалов на основе РС, как высокая биосовместимость, регулируемая биорезорбция в организме, способность обеспечивать неоваскуляризацию и иннервацию поврежденных тканей, наиболее перспективной областью их применения на сегодняшний день является медицина [2].

В настоящей работе было проведено исследование способности матриксов, полученных на основе водных растворов РС и биологически активных пептидов (5 различных комбинаций), поддерживать рост и дифференцировку нейронов и глиальных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК) человека. Было показано различие в адгезии клеточных культур к исследуемым матриксам, а также продемонстрировано снижение пролиферативной активности дифференцирующихся нейронов на всех подложках. С помощью ПЦР в реальном времени показана дифференциальная экспрессия ряда генов в нейронах и глиальных клетках на разных подложках. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-1357 и договора № 69/21 — СИН1357.

Литература:

1. Gattazzo F, Urciuolo A. and Bonaldo P. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014. V. 1840. P. 2506–2519.
2. Debabov V.G., Bogush V.G. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020. V. 6. P. 3745–3761.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ММСК ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗ ГЕПАРИНА

**И.К. Норкин¹, К.А. Юрова¹, О.Г. Хазиахматова¹,
В.В. Малащенко¹, И.А. Хлусов^{1,2}, Л.С. Литвинова¹**

¹ ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет
им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

² Сибирский государственный медицинский
университет, Томск, Россия

e-mail: norkin_igor@mail.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, гепарин, *in vitro*, остеодифференцировка, стволовость.

В целях предотвращения послеоперационных патологических состояний, вызванных гиперкоагуляцией, используют стратегии с применением антикоагулянтов (в т.ч., гепарина). Однако описанная тактика лечения приводит к нарушению процессов миграции и адгезии мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), что негативно влияет на формирование костной мозоли. При этом влияние гепарина на остеодифференцировку носит противоречивый характер.

Материалом исследования служила культура ММСК, выделенная из жировой ткани человека (протокол № 1 от 22.03.2021 БФУ им. И. Канта). Для эксперимента использовались клетки с принадлежностью к ММСК в соответствии с минимальными критериями Международного общества клеточной терапии. В исследовании изучали 4 группы: контроль без гепарина; модели культивирования ММСК с гепарином в терапевтических концентрациях (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл). Культивирование ММСК проводили при 37°C, 100% влажности, содержащей 5% CO₂ в течение 14 сут. Для постановки эксперимента использовали ППС (5% FBS, 400 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 2 mM L-глутамин, αMEM). Оценку поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, CD45, CD14, CD20, CD34 проводили на 14 сут. на цитометре MACS Quant FL7 system (Miltenyi Biotec, Germany). Анализ уровней относительной экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (ALPL, RUNX2, BMP2, BMP6) проводили

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария). Статистический анализ проводили с использованием IBM SPSS Statistics 20.

При добавлении гепарина в исследуемых концентрациях (0,5, 0,75 и 1 МЕ/мл) в культуру ММСК доля CD90+, CD105+ и CD73+ клеток статистически значимо не изменялась относительно контроля. В модели культивирования ММСК с гепарином в концентрации 1 МЕ/мл экспрессия мРНК гена щелочной фосфатазы (ALPL) увеличилась в 26 раз (относительно контроля), что свидетельствует о дифференцировке ММСК в остеобласты. Экспрессия гена ALPL относится к ранним стадиям остеодифференцировки и необходима для минерализации межклеточного матрикса. Экспрессия мРНК генов RUNX2, BMP2 и BMP6 не изменялась между исследуемыми группами. Однако наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии мРНК генов (RUNX2, BMP2 и BMP6) при добавлении гепарина в концентрации 1 МЕ/мл.

Таким образом, выявленное повышение экспрессии мРНК генов остеодифференцировки (ALPL, RUNX2, BMP2, BMP6) в присутствии гепарина в терапевтических концентрациях (в сравнении с контролем) может свидетельствовать об участии гепарина (1 МЕ/мл) в инициации остеодифференцировки ММСК в условиях сокультивирования *in vitro*. Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Программы стратегического академического лидерства ПРИОРИТЕТ 2030 в СибГМУ.

СОЗДАНИЕ ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ Т-КАДГЕРИН ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ

И.Д. Ожималов, М.Н. Балацкая, В.С. Попов, И.Б. Бродский, Е.В. Семина, М.А. Кулебякина, В.Ю. Сысоева, А.В. Балацкий, К.А. Рубина, Н.И. Калинина

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

e-mail: i.ozhimalov@gmail.com

Ключевые слова: Т-кадгерин, адипонектин, регенерация, экзосомы.

Адипонектин — гормон жировой ткани, являющийся одним из важнейших регуляторов регенерации тканей. Его влияние на регенерацию скелетных мышц [1], ангиогенез и предотвращение поражения кровеносных сосудов и сердца опосредовано его взаимодействием с мембранным рецептором Т-кадгерин [2, 3]. В частности, связывание адипонектина с Т-кадгерин вызывает повышение продукции внеклеточных везикул, которые необходимы для реализации влияния адипонектина на регенерацию тканей [4].

Для исследования процессов регенерации, опосредованных Т-кадгерин, нами была выведена линия нокаутных мышей путем скрещивания особей с флуксированным 3 экзоном гена Т-кадгерина (*Cdh13*) и особей с конститутивно активной Cre-рекомбиназой. С помощью метода ПЦР мы продемонстрировали отсутствие 3 экзона как в ДНК, так и мРНК белка Т-кадгерина в образцах нокаутных мышей. Мы также проанализировали содержание Т-кадгерина в образцах аорт, сердец и скелетных мышц с помощью иммуноблоттинга. Отсутствие Т-кадгерина также было подтверждено с помощью протономного анализа образцов скелетных мышц.

Мы показали, что масса тела, давление крови и другие параметры значимо не отличались у нокаутных мышей по сравнению с мышами линии C57Bl, которые экспрессируют ген Т-кадгерина. Поскольку взаимодействие адипонектина с Т-кадгерин влияет на регенерацию скелетных мышц, мы сопоставили способность к бегу на беговой дорожке нокаутных и контрольных мышей. Вопреки нашему предположению, мыши, нокаутные по Т-кадгерину, уставали медленнее и пробегали значимо более длинную дистанцию по сравнению с мышами контрольной линии. Мы проанализировали молекулярные механизмы таких различий. В частности, мы оценили уровень фосфорилирования АМФ-киназы, а также продукцию внеклеточных везикул у нокаутных мышей и животных контрольной линии. Таким образом, полученная нами линия мышей нокаутных по Т-кадгерину открывает возможности для проведения исследований участия этого белка в регенерации тканей. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 19-29-04118.

Литература:

1. Tanaka Y., Kita S., Nishizawa H. et al. *Sci. Rep.* 2019. V.9. P.16.
2. Denzel M.S., Scimia M.-C., Zumstein P.M. et al. *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. P. 4342–4352
3. Parker-Duffen J.L., Nakamura K., Silver M. et al. *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 24886–24897
4. Obata Y., Kita S., Koyama Y. et al. *JCI insight.* 2018. V. 3. № . 8.

ПРИМЕНЕНИЕ ДИОПСИДА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ РЕКОМБИНАНТНОГО BMP-2 В СОСТАВЕ ГИБРИДНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

П.А. Орлова¹, А.В. Жулина¹, М.С. Кривоzubов¹, А.В. Громов¹, А.С. Карягина^{1,2,3}

¹ *НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия*

² *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия*

e-mail: p.orlova88@gmail.com

Ключевые слова: силикатная керамика, диопсид, BMP-2.

Эффективным решением проблемы замещения костных дефектов может быть разработка остеоиндуктивных гибридных имплантатов на основе силикатной керамики с адсорбированным на ней рекомбинантным белком BMP-2. Различные варианты силикатной керамики обладают высокой биоактивностью, биосовместимостью, хорошими механическими свойствами, способствуют остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток и, согласно результатам наших исследований, обладают высокой сорбционной емкостью по отношению к BMP-2.

Эффективность применения имплантатов на основе силикатной керамики была исследована на трех моделях: 1) при введении суспензии содержащих и не содержащих BMP-2 частиц диопсида (CaMgSi₂O₆) и волластонита (CaSiO₃) в гиалуроновой кислоте под надкостницу черепа мыши; 2) при имплантации суспензии частиц диопсида с/без BMP-2, введенной в диски

из ксеногенного ДКМ, в краниальные дефекты критического размера у мышей; 3) при имплантации суспензии частиц диоксида с/без BMP-2, введенной в диски из ДКМ, в бедренную мышцу мыши. Мезопористые частицы диоксида и волластонита были получены в НИТУ «МИСиС». Особенности минерализации и регенерации тканей в области имплантации исследовали с помощью микро-КТ и гистологического анализа.

В эксперименте 1 на протяжении 6 недель наблюдалась выраженная динамика минерализации тканей и остеогенеза в случае диоксида, содержащего BMP-2. Волластонит, необратимо связывающий BMP-2, вызывал сильную воспалительную реакцию, сопровождавшуюся агрегацией микрочастиц на фоне слабо выраженного формирования костной ткани. В эксперименте 2 при введении диоксида с BMP-2 на сроке 6 недель после имплантации наблюдалось практически полное замещение костных дефектов новой костной тканью, содержащей костный мозг, при слабо выраженной реакции на инородное тело. В эксперименте 3 на сроке 12 недель наблюдалось ремоделирование костной ткани внутри имплантата и образование вокруг него покрытой надкостницей костной капсулы с трабекулами новообразованной костной ткани и костным мозгом.

Диоксид может успешно применяться в качестве носителя BMP-2 в составе гибридных имплантатов для инженерии костной ткани. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 22-15-00216.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО EPO И BMP-2 В СОСТАВЕ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

П.А. Орлова

НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: p.orlova88@gmail.com

Ключевые слова: эритропоэтин, BMP-2, полиэфирэфиркетон, сверхвысокомолекулярный полиэтилен.

Применение кровяного белка эритропоэтина (EPO) совместно с костным морфогенетическим белком-2 (BMP-2) в составе костнопластических материалов представляет значительный интерес благодаря тому, что они способствуют росту костной ткани по независимым молекулярным механизмам.

Целью данной работы было исследование остеиндуктивного потенциала композитных конструкций на основе новых вариантов BMP-2 и EPO, полученных ранее методом микробиологического синтеза [1, 2], в составе природных и синтетических материалов.

Был проведен ряд экспериментов по введению имплантатов на основе рекомбинантных белков в составе различных носителей в краниальные дефекты критического размера на мышах. В качестве природных носителей были использованы диски диаметром 4 мм из деминерализованного костного матрикса (ДКМ). В качестве синтетических носителей, полученных сотрудниками МИСиС, были использованы диски из полиэфирэфиркетона (ПЭЭК), диски из ПЭЭК с добавлением гидроксилата (ГАП), а также диски из сверхвысокомолекулярного полиэтилена с ГАП (СВМПЭ/ГАП). Динамику образования минерализованной костной ткани в области дефекта

оценивали с помощью микрокомпьютерной томографии. Исследование регенератов проводилось с помощью гистологического анализа и иммуногистохимического анализа на M2-макрофаги.

Минерализованная ткань наблюдалась в области дефекта уже на 3-й неделе после имплантации во всех группах, в состав которых входил BMP-2. Совместное применение BMP-2 и EPO способствовало усилению ангиогенеза новообразованной костной ткани. На 6-й неделе формировалось значительное количество новообразованной минерализованной костной ткани с включениями зрелого костного мозга. Максимальная поляризация M2-макрофагов наблюдалась в случае применения материалов на основе ДКМ.

Комбинация новых вариантов BMP-2 и EPO существенно повышает остеиндуктивные свойства широкого спектра остеопластических материалов, перспективных для применения в регенеративной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 16-15-00133 и 22-15-00216.

Литература:

1. Karyagina A.S. et al. Biochemistry (Moscow) 82 (2017) 613–624.
2. Karyagina A.S. et al. Biochemistry (Moscow) 84 (2019) 20–32.

АУГМЕНТАЦИЯ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Н.В. Орлова¹, А.Н. Муравьев^{1,4}, А.А. Горелова^{1,3}, А.Н. Ремезова¹, Т.И. Виноградова¹, Н.М. Юдинцева², Ю.А. Нащекина², Н.В. Заболотных¹, А.А. Лебедев¹, П.К. Яблонский^{1,3}

¹ Санкт-Петербургский НИИ 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

e-mail: nadinbat@gmail.com

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, мезенхимные стволовые клетки, малый мочевого пузыря, биодеградируемые полимеры, поли-L-лактид.

До сих пор остаются нерешенными проблемы, связанные с реконструкцией мочевого пузыря [1]. Замещение фрагментами желудочно-кишечного тракта, хоть и является золотым стандартом, почти всегда приводит к различным осложнениям. Применение в урологии методов регенеративной медицины и тканевой инженерии может способствовать улучшению результатов лечения многих патологических состояний [2]. На базе ФГБУ СПбНИИФ впервые в мировой практике выполнено успешное замещение дефекта мочевого пузыря кролика после его парциальной резекции с использованием тканеинженерного лоскута, содержащего аллогенные мезенхимные стволовые клетки [3].

Цель: экспериментальное изучение возможности применения аллогенного тканеинженерного трансплантата для замещения дефекта стенки мочевого пузыря.

Материалы и методы: 15 кроликам после парциальной резекции мочевого пузыря выполнена

аугментационная цистопластика скаффолдами, содержащими гладкие миоциты с уротелием, фибробласты и мезенхимные стволовые клетки.

Результаты: В 100% случаев замещения участка мочевого пузыря бесклеточной матрицей или скаффолдами, содержащими гладкие миоциты с уротелием и фибробласты, произошло отторжение имплантата. В группе, получившей скаффолд с мезенхимными стволовыми клетками, в 5 случаях из 6 произошел лизис матрицы, емкость мочевого пузыря через 2,5 месяца после операции оказалась сравнима с дооперационной. Восстановление морфологической структуры стенки мочевого подтверждено гистологически.

Заключение: Применение тканеинженерной конструкции, состоящей из композитной матрицы и мезенхимных стволовых клеток кролика оказалось эффективным для реконструкции небольших дефектов мочевого пузыря. Дальнейшая разработка метода создания многокомпонентного трансплантата с использованием аллогенных клеток может способствовать улучшению результатов лечения таких патологий, при которых получение аутологичного материала не представляется возможным. В настоящее время на базе ФГБУ «СПбНИИФ» выполняется исследование по тканеинженерной аугментации мочевого пузыря, вплоть до тотального его замещения (за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20167 и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от «14» апреля 2022 г. № 20/2022).

Литература:

1. Муравьев А.Н., Орлова Н.В., Блинова М.И. и др. Цитология. 2015. Т. 57(1). С. 14–18.
2. Yudin N.M., Nashchekina Y.A., Blinova M.I. et al. Int J Nanomedicine. 2016. V. 11. P. 4521–4533.
3. Orlova N.V., Muraviov A.N., Vinogradova T.I., et al. Cell. Ther. and Transpl. 2019. V. 8. № 2. P. 68–73.

ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ БИОМЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ НАТИВНОГО КОЛЛАГЕНА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Е.О. Осидак¹, А.Ю. Андреев^{1,2}, С.П. Домогатский^{1,3}

¹ ООО фирмы «Имтек», Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ глазных болезней Минобрнауки России, Москва, Россия

³ ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: egorosidak@gmail.com

Ключевые слова: Viscoll, коллагеновые мембраны, биомеханика, роговица.

В различных областях клинической медицины требуются биологически совместимые мембраны: для восстановления кожных дефектов (комбустиология), для регенерации костной ткани (челюстно-лицевая хирургия/стоматология); для пластики дефектов твердой мозговой оболочки (нейрохирургия), для восстановления роговицы (офтальмология) и барабанной перепонки (отоларингология). Нативный высокоочищенный коллаген обладает высокой степенью биосовместимости и практически не индуцирует иммунного ответа. Мембраны из коллагена наиболее перспективны для использования в клинической практике. Для того чтобы аналогичными свойствами обладали медицинские изделия, изготовленные из экстрагируемого

коллагена, необходимо при их производстве минимизировать негативное воздействие технологических процессов. К таким воздействиям относятся химическая или физическая сшивка. Сшивка позволяет стабилизировать структуру изделия и существенно увеличить прочность коллагеновой мембраны. С другой стороны, использование химических сшивок приводит к существенному ухудшению проникновения клеток-хозяина внутрь имплантата. Отсутствие миграции клеток внутрь имплантированного биоматериала делают невозможным процесс нормальной регенерации поврежденной ткани, что в конечном счете приводит к различным осложнениям после операции. Нами предложен и успешно опробован новый подход для повышения прочностных характеристик биомедицинских конструкций: изготовление стабильных и прочных коллагеновых мембран из концентрированных до уровня 10% растворов очищенного коллагена. В основе подхода лежит запатентованная масштабируемая технология получения стерильного прозрачного концентрированного раствора биосовместимого коллагена (коллаген Viscoll®). Этот подход лег в основу проекта по разработке и внедрению в клиническую практику имплантируемых коллагеновых мембран. Эффективность, безопасность и биосовместимость материалов, изготовленных из концентрированных растворов коллагена Viscoll® была доказана как в *in vitro* [1], так и в *in vivo* моделях [2], [3]. Ключевым практическим результатом данного проекта стала технология получения медицинского изделия «Мембрана коллагеновая Viscoll® для восстановления роговицы». По этому изделию собрано полное регистрационное досье и подана заявка в Росздравнадзор на регистрацию. Старт клинических испытаний запланирован на 2023 год. Проект поддержан Фондом содействия инновациям, договор № 793ГКС7-15/79518.

Литература:

1. Osidak E.O., Kalabusheva E.P., Alpeeva E.V. et al. Materialia. 2021. V. 20(11). P. 101217.
2. Andreev A.A., Osidak E.O., Grigoriev T.E. et al. Exp Eye Res. 2021. V. 207(44). P. 108580.
3. Кирпатовский В.И., Камалов Д.М., Ефименко А.Ю., и др. Урология. 2016. № 6. С. 34–43.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНАЯ ТЕРАПИЯ — КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Г.В. Павлова^{1,2,3}, В.А. Колесникова¹, А.В. Ревущин¹, Д.Ю. Усачев², А.М. Копылов⁴

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

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

e-mail: lkorochnik@mail.ru

Ключевые слова: глиома головного мозга, дифференцировочная терапия, G-квадруплекс biG3T, малые молекулы.

Глиобластома является одной из самых тяжелых форм опухолеобразования в организме человека с крайне неблагоприятным прогнозом. Встречаемость данной патологии составляет 3,5 случая на 100 000

населения ежегодно. На данный момент не существует эффективного способа лечения этого злокачественного типа образований мозга. Все известные методы лечения (хирургия, лучевая терапия, химиотерапия) дают лишь незначительное увеличение времени жизни пациента. Гетерогенная структура глиобластомы с aberrантной регуляцией клеточной пролиферации позволяет опухоли выживать при различных терапевтических воздействиях. При лучевой терапии или химиотерапии опухолевые клетки гибнут, однако, часть клеток резистентна и определяет дальнейший рост опухоли. Таким образом, опухоль способна сопротивляться различным видам терапии и активно разрастаться. Помимо цитотоксических подходов терапии следует рассмотреть другие варианты воздействия на глиобластому человека. Прямо противоположная стратегия — стимулировать «созревание» опухолевых клеток, что приведет к потере их пролиферативного потенциала. Для оценки возможности регулировать пролиферативный и дифференцировочный потенциал опухолевых клеток глиобластомы создана коллекция первичных и перевиваемых клеточных культур из опухолевой ткани пациентов. Возможность объединения молекулярно-генетических характеристик клеток этой коллекции с данными МРТ и ПЭТ для исходной опухоли позволяет лучше понять происхождение глиом головного мозга. Предложен принципиально новый подход к лечению глиомы — «дифференцировочная терапия», который основан на цитостатическом воздействии на клетки G-квадруплексом biG3T, обладающим антипролиферативной активностью, в комбинации с молекулами-индукторами, управляющими каскадами нейрогенеза — SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF. Молекулы-индукторы SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF используют для воздействия на каскады индуцированных плюрипотентных клеток и (ИПСК) для их дифференцировки в нейроны. При временном снижении пролиферативной активности опухолевых клеток после воздействия G-квадруплекса, молекулы-индукторы способны остановить деление клеток опухоли и направить их дифференцировку в зрелое состояние. Дифференцировочная терапия оказывается эффективной и для опухолевых стволовых Nestin, PROM1(CD133)-позитивных клеток, устойчивых к химиотерапии и лучевой терапии. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075152020809 (13.1902.21.0030)).

РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ И СВОЙСТВ GDNF: НЕЙРОПРОТЕКТОР ИЛИ НЕЙРОИНДУКТОР?

Г.В. Павлова^{1,2,3}, В.В. Паршина¹, А.В. Ревизин¹

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

² *ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия*

³ *Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

e-mail: lkorchkin@mail.ru

Ключевые слова: нейральная дифференцировка, прогениторные клетки, болезнь Паркинсона, нейротрофический фактор GDNF.

Болезнь Паркинсона является вторым по распространенности возрастным нейродегенеративным

расстройством после болезни Альцгеймера. От 7 до 10 миллионов человек во всем мире страдают болезнью Паркинсона. В первую очередь эта болезнь характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов. На данный момент подходы к терапии болезни Паркинсона нельзя назвать эффективными. В связи с этим чрезвычайно актуальным является поиск новых факторов, способных приостанавливать течение заболевания или, в идеале, восстанавливать жизнеспособность дофаминергических нейронов в мозгу.

Один из интересных и перспективных факторов, который рассматривается как кандидат на терапию болезни Паркинсона — это глиальный нейротрофический фактор (GDNF). GDNF занимает приоритетные позиции при использовании в качестве нейропротектора и индуктора нейральной дифференцировки прогениторных/стволовых клеток.

GDNF необходим для поддержания жизнеспособности дофаминергических нейронов головного мозга, а также периферических, симпатических, парасимпатических и сенсорных нейронов. При защите поврежденных нейронов он обладает в 5–10 раз большей эффективностью, чем BDNF. Широкий диапазон свойств GDNF не мог не обратить на себя внимание ученых, так и разработчиков лекарственных средств. Доклинические исследования, которые были проведены на грызунах и приматах, показали эффективность GDNF как потенциального терапевтического агента. Однако результаты клинических испытаний на людях оказались противоречивыми. Клинические исследования рекомбинантного GDNF при интрацеребровентрикулярном введении пациентам с болезнью Паркинсона показали, что улучшения были незначительны или отсутствовали. Введение рекомбинантного GDNF в полостное тело мозга пациента с помощью минипомпы на I фазе клинических испытаний показывало положительный эффект. Впоследствии, данный эффект не был подтвержден на II-ой фазе двойных слепых клинических испытаний. Возможно, причина неудач клинических испытаний обусловлена тем, что в исследованиях была использована изоформа GDNF, которая поддерживает жизнеспособность нейронов в норме, но не обладает высокой нейроиндукторной способностью. Нами были обнаружены малые формы xGDNF, которые обладают преимущественно нейроиндукторными свойствами, а малые размеры могут помочь преодолению гематоэнцефалического барьера. Эти изоформы можно рассматривать как перспективные терапевтические молекулы не только для болезни Паркинсона, но и для других нейродегенеративных заболеваний. Сформулирована концепция о возможности создания терапевтического подхода на основе управления каскадами нейральной дифференцировки прогениторных клеток нормы и патологии. Используя воздействие на главные регуляторы эволюционно консервативных систем, которые управляют нейрогенезом, можно достигнуть «созревания» клеток нейрального ряда, что привлекательно для использования в терапии при нейродегенеративных заболеваниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030)).

РОЛЬ АКТИВНО МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА В РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛИ К ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

С.А. Павлова¹, А.В. Голанов², Г.В. Павлова^{1,2}

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

² *ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия*

e-mail: pavlova.sweti@yandex.ru

Ключевые слова: глиома, миграция клеток, облучение, резистентность опухолевых клеток.

Известные подходы к терапии глиомы человека ограничены хирургическим удалением опухоли, химиотерапией и лучевой терапией. Целью нашей работы было понять, как изменяются пролиферативные и миграционные свойства опухолевых клеток глиомы человека после воздействия лучевой терапии.

Из клеточной культуры глиомы человека G-01, полученной из послеоперационного материала, была выделена популяция активно мигрирующих клеток. Для эксперимента были использованы культуры, выведенные из данной популяции через 2 пассажа после разделения (G-01CM) и через 8 пассажей (G-01M). При описании результатов экспериментов культура G-01 принимается за контрольную и значения для нее принимаются за 100%, а для культур G-01CM и G-01M полученные данные представлены в виде доли от контроля.

В ходе оценки пролиферативной активности полученных культур методом MTS теста наблюдалось повышение значений по сравнению с исходной культурой на 43% для G-01CM и на 250% для G-01M.

При оценке миграционной активности данных культур было выявлено увеличение миграционной способности культур G-01CM и G-01M по сравнению с исходной культурой G-01. Наиболее выраженное увеличение наблюдается в культуре G-01CM, уровень миграционной активности которой составляет 473% от исходной культуры. Для культуры G-01M это значение составляет 158%.

Все культуры были подвергнуты однократному вертикальному тормозному излучению с номинальной энергией 6 МэВ и мощностью 600 доз/мин на приборе TrueBeam STx дозой 20 Гр. Исследования проводились через 3 и 7 дней после облучения.

При оценке пролиферативной активности культур G-01CM и G-01M после облучения было выявлено снижение показателей по сравнению с необлученными культурами с сохранением повышенной пролиферативной активности относительно облученной культуры G-01. На 7 день после облучения в культуре G-01CM наблюдается продолжение снижения уровня пролиферативной активности по сравнению с необлученными образцами, при этом в культуре G-01M наблюдается рост пролиферации.

При оценке миграционной активности культур после облучения наблюдается снижение показателей в культурах G-01CM и G-01M по сравнению с необлученными образцами, и сохранение для G-01CM повышенных значений миграционной активности по сравнению с облученной культурой G-01.

Таким образом, было показано, что в культурах, выведенных из популяции активно мигрирующих клеток, даже после облучения сохраняется высокий уровень пролиферативной активности, но при этом наблюдается снижение их миграционной активности. Исходя из этого можно сделать предположение, что в культурах глиом мигрирующие

клетки обладают большей устойчивостью к лучевой терапии, при этом после облучения данные клетки частично теряют способность к миграции с одновременной активацией процессов пролиферации. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030).

СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА

С.В. Пак^{1,2}, Е.И. Зырянова^{1,2}, Е.П. Банин¹, Н.М. Кузнецов¹, А.Е. Крупнин¹, С.В. Крашенинников¹, П.В. Дмитриков¹, А.А. Пучков¹, В.В. Ковалева¹, С.Н. Чвалун^{1,3}

¹ *НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия*

² *НИУ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

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

e-mail: PakSofya@yandex.ru

Ключевые слова: мягкая робототехника, стимул-чувствительные материалы, полимерные наноконкомпозиты, 3D печать, сердечная недостаточность, поддержка работы сердца.

Согласно ВОЗ за период 2000–2019 гг. сердечно-сосудистые заболевания занимают первую позицию среди причин смертности. Согласно оценкам Европейского общества кардиологов Россия, относится к странам очень высокого риска по данной группе заболеваний с показателями смертности более 450 для мужчин и 350 для женщин на 100000 населения [1]. Патологии сердца могут приводить к эпизодической аритмии с сопутствующими рисками остановки сердца и летальным исходом. Ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатия с сопутствующей сердечной недостаточностью, при которой показано использование кардиостимулятора, является самым распространенным заболеванием в мире.

Одним из превентивных методов лечения, в дополнение к фармакологической терапии, является хирургическое вмешательство с имплантацией кардиостимулятора. Однако при установке подобных приборов существенны риски отторжения, кроме того, существующие приборы неэффективно занимают пространство в полостях организма и имеют высокую стоимость. Актуальной задачей является разработка устройства, способного ускорить процесс реабилитации, а также улучшить качество жизни пациентов. Перспективным подходом является создание имплантируемых полимерных каркасов сетчатой структуры, позволяющих направленно стимулировать работу сердечной мышцы. Важным становится создание имплантата по индивидуальным характеристикам сердца, что позволит перейти к персонализированному изделию с высокой эффективностью. Такой подход может быть реализован с применением аддитивных технологий для подбора материала каркаса сетки, обладающего износостойкостью, способностью к большим обратимым деформациям, эластичностью, биосовместимостью, нетоксичностью и др.

Целью исследования является создание биосовместимого высокоэластичного электропроводящего каркаса. Для создания персонального медицинского устройства, используя данные компьютерной томографии, была получена 3D реконструкция сердца с применением методов компьютерного моделирования. Проведен подбор коммерчески доступного полимерного материала

для создания каркаса с помощью технологии 3D печати: REC Flex TPE, REC TPU Easyflex, eSun eLastic, Raise TPU-95A, REC Rubber SEBS, Bestfilament SBS Watson. Физико-химические свойства материалов были охарактеризованы методами дифференциальной сканирующей калориметрии, термогравиметрического анализа, гель-проникающей хроматографии, проведены механические испытания филаментов при одноосном растяжении и проведено сравнение полученных характеристик и свойств эпикардальных волокон. В работе обсуждаются перспективы применения проводящих добавок для создания новых материалов для аддитивных технологий. Исследование выполнено при финансовой поддержке Госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Piepoli M.F., Hoes A.W., Agewall S. et al. Eur. Heart J. 2016. V. 37. P. 2315–2381.

ВЫЯВЛЕНИЕ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЗАПУСКА АПОПТОЗА ХИМИЧЕСКИМ ИНДУКТОРОМ ДИМЕРИЗАЦИИ (CID) В НК-КЛЕТКАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕНОМ ИНДУЦИРУЕМОЙ КАСПАЗЫ 9 (iCASP9)

А.И. Паламарчук, Е.И. Коваленко, М.А. Стрельцова

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: palanastasia@yandex.ru

Ключевые слова: иммунотерапия, НК-клетки, генетическая модификация, индуцируемая каспаза 9 (iCasp9), каталитическая субъединица теломеразы (hTERT), направленная элиминация модифицированных клеток, апоптоз.

Применение НК-клеток является развивающимся направлением терапии злокачественных новообразований, тем не менее автономия терапевтических клеток представляет потенциальную опасность, в частности, после их генетической модификации. Введение систем контроля в клетки, в особенности, трансдукция гена iCasp9 суицидной конструкции, на основе индуцируемой каспазы 9, активируемой химическим индуктором димеризации (CID), является наиболее эффективным подходом для направленной элиминации модифицированных клеток [1], [2]. Нами было показано, что iCasp9-НК-клетки могут демонстрировать устойчивость к действию димеризатора. Также была прослежена взаимосвязь между эффективностью индукции iCasp9-опосредованного апоптоза и уровнем дифференцировки НК-клеток, разделённых по поверхностной экспрессии KIR2DL2/DL3 и NKG2C. Менее дифференцированные iCasp9-НК-клетки с фенотипом KIR2DL2DL3⁻ эффективнее индуцировали апоптоз в ответ на димеризатор в сравнении с более дифференцированными KIR2DL2DL3⁺ [3]. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-75-00110.

Литература:

1. Varese C.N., Felizardo T.C., Sellers S.E., et al. 2016. Stem Cells V. 33., № 1. – 91–100p.
2. Marin V., Cribioli E., Philip B., et al. 2012 Hum. Gene Ther. Methods V. 23, 376–386.
3. Palamarchuk A.I., Alekseeva N.A., Streltsova M.A., et al. Int. J. Mol. Sci., 2021. V. 22., № 24.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2

Д.Д. Паншин, А.А. Лобов, А.Б. Малашичева

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: panshin@killas.ru

Ключевые слова: NOTCH, RUNX2.

Сигнальный путь NOTCH и фактор транскрипции RUNX2 являются важными и консервативными регуляторами клеточных судеб. Сигнальный каскад NOTCH принимает участие в регуляции множества клеточных процессов в организме, играет заметную роль в эмбриональном развитии и поддержании тканевого гомеостаза [1]. Нарушение его регуляции приводит к появлению аномалий развития и возникновению целого ряда заболеваний. Основная роль фактора транскрипции RUNX2 заключается в регуляции развития остеобластов и образования костной ткани в организме. В то же время сверхэкспрессия RUNX2 характерна для метастатического рака, и его роль, по-видимому, выходит за рамки контроля остеогенной дифференцировки [2].

Во многом процессы, регулируемые сигнальными путями Notch и RUNX2, перекрываются, тем не менее, пока не было показано прямой взаимосвязи двух этих сигнальных каскадов. Чтобы проверить это, мы исследовали влияние сверхэкспрессии RUNX2 и внутриклеточного домена NOTCH на экспрессию генов, связанных с этими сигнальными путями.

Для активации сигнальных путей Notch и RUNX2 мы трансфицировали клетки HeLa и HEK-293T плазмидами, несущими транскрипт RUNX2 и последовательность, соответствующую внутриклеточному домену NOTCH1 (N1ICD), после чего выделяли РНК и определяли уровень экспрессии RUNX2 и NOTCH и их гены-мишени оценивали с помощью ПЦР в реальном времени.

Активация RUNX2 в клетках HeLa и HEK-293T приводила к повышенной экспрессии компонентов сигнального пути Notch (NOTCH1 и NOTCH2), а также гена-мишени Notch (HES1), что указывает на активацию этого сигнального пути при сверхэкспрессии RUNX2. RUNX2 был обнаружен во всех экспериментальных образцах, трансфицированных конструкциями NICD и RUNX2, но не в контрольных клетках HeLa. Примечательно, что уровень RUNX2 в клетках, трансфицированных обеими плазмидами, был значительно ниже, чем при трансфекции одной конструкцией RUNX2. Можно предположить, что N1ICD активирует экспрессию RUNX2, но в то же время не позволяет ей подняться выше определенного уровня. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ номер 18-14-00152-П.

Литература:

1. Yamamoto S., Schulze K., Bellen H. Introduction to Notch Signaling Methods in Molecular Biology. 2014. p. 1–14.
2. Zeng L. et al. Functional analysis of novel RUNX2 mutations in cleidocranial dysplasia Mutagenesis. 2017. vol. 32, number 4. p. 437–443.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТРЕКОВЫХ МЕМБРАН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ И РАН

Б.А. Парамонов¹, Д.Ю. Андреев¹,
П.В. Ястребов¹, Д.В. Щеголев²,
П.В. Апель², А.Н. Нечаев², Н.С. Дмитриев²,
Р.К. Рагимова², Н.М. Парамонова^{3,4}

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова
МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова
Объединенного института ядерных исследований,
Дубна, Россия

³ Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Государственный научно-исследовательский
испытательный институт военной медицины
МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: pba1959@mail.ru

Ключевые слова: трековые мембраны, коллаген, хитозан, антибактериальные пептиды; нанокластеры серебра, полиэтиленерефталат, клетки кожи, ожоги, раны и трофические язвы

Совершенствование методов и средств лечения ожогов и ран остается актуальной задачей. Перспективным направлением является использование так называемых «трековых мембран» (ТМ) в качестве раневых покрытий. Такие мембраны изготавливаются из полимерных плёнок толщиной 12–25 микрон посредством бомбардировки их высоко-энергетичными ионами (аргон, криптон), пробивающими плёнку насквозь. В местах прохождения ионов образуются сквозные каналы (треки) субмикронного размера. ТМ является «микробным фильтром», осуществляющим защиту от инфекции и обеспечивающим газо- и влагообмен раны, что стимулирует репаративные процессы.

Целью исследования является разработка серии раневых покрытий на основе трековых мембран для лечения различных типов ран и трофических язв.

Проведены сравнительные исследования свойств трековых мембран с различными параметрами объемной пористости и способами обработки поверхности. Изучали свойства ТМ с порами различной формы («цилиндр», «конус», «песочные часы», «галстукообразные», «сигарообразные»), диаметра (0,6 мкм, 2,0 мкм до 4,0 мкм) и плотностью пор (от $0,7 \times 10^7$ до $3,2 \times 10^8$ пор на 1 см²). Для модификации поверхности ТМ использовали коллаген, растворы α -цепей коллагена, хитозан, дибутитролохитин, антибактериальные пептиды (пентодифенин), нанокластеры серебра. На мембранах культивировали клетки кожи (кератиноциты и фибробласты), а также сложные клеточные композиции. В опытах на животных применяли ТМ для лечения ран различного генеза.

Для практического применения в клинической практике из множества полимеров предпочтение отдано биосовместимому материалу — полиэтиленерефталату. Определены оптимальные параметры раневых покрытий для ожогов, ран и трофических язв. Для лечения поверхностных ожогов и донорских ран лучше всего подходит ТМ с порами 0,6 мкм, а для трофических язв — 2,0 и 4,0 мкм. Такие пленки обеспечивают интенсивность влагопотерь на уровне $2,5 \div 10,5$ г·м⁻²·час⁻¹ в диапазоне внешних температур от +1° до +45°С. Нанесение нанокластеров серебра придает ТМ антибактериальные свойства в отношении широкого спектра микроорганизмов. Напыление антибактериального пептида пентодифенина в дозе 5нг/см² обеспечивает подавление патогенной микрофлоры в ранах.

Таким образом, применение ТМ позволяет решить сразу несколько задач. При лечении поверхностных ожогов покрытие длительное время находится на ранах и не требует замены. Кроме того, ТМ могут служить подложкой для культивирования и последующей трансплантации кератиноцитов и фибробластов на раны.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОЛЛАГЕНАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ И РУБЦОВ КОЖИ

Б.А. Парамонов¹, Е.М. Пожарская¹,
К.В. Сивак², К.И. Стосман², Н.В. Скворцов³,
А.О. Морозова⁴, Н.М. Парамонова^{5,6}

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова
МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

³ НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Государственный научно-исследовательский
испытательный институт военной медицины
МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: pba1959@mail.ru

Ключевые слова: коллагеназа, ожоги, раны, рубцы кожи.

Ферменты с коллагенолитической активностью используются для очищения ран от тканевого детрита и для лечения рубцов кожи. Поиск новых источников получения ферментов и совершенствование медикаментозных рецептур является актуальной задачей хирургии.

Проведены сравнительные исследования свойств коллагенолитических рецептур: из гепатопанкреаса камчатского краба («Ферменкол»); из желудочно-кишечного тракта африканского сома рода *Clare* («Кларидаза») и микробной (продуцент *Clostridium histolyticum* 468 — препарат «Коллализин»). Изучали параметры острой, подострой и хронической токсичности, тератогенное, мутагенное, эмбриотоксическое действие. Всего в опытах задействовано 58 кроликов, 200 крыс и 300 мышей. Специфическую активность оценивали в опытах *in vitro* (тест с фотожелатиной; аминопептидазная активность с синтетическим субстратом «Acros»; коллагенолитическая активность по реакции с субстратом «ВАРНА»; по динамике убывания коллагена в маркерных биоптатах рубцовой ткани), а также в опытах на животных. Некролитическую активность (способность растворять раневой детрит) оценивали по скорости очищения ожоговых ран у экспериментальных животных. Моделировали рубцы кожи у крыс, на которые наносили изучаемые рецептуры. Оценку «противорубцовой активности» проводили посредством измерения толщины эпидермиса и дермы ультразвуковым *DermaScan* (Дания) на частоте 20 МГц. Оценивали гистологическую структуру тканей в динамике.

Установлено, что «Ферменкол» и «Кларидаза» имеют близкие параметры токсичности и специфической активности. Они относятся к малотоксичным (IY классу опасности) химических соединений. Токсические эффекты не развиваются при различных путях введения в дозах до 5000 мг/кг массы тела. Параметры общей

протеолитической и коллагенолитической активности практически одинаковы и существенно (в 7 раз) превышают таковые препарата «Коллализин». Установлено, что «Ферменкол» и «Кларидаз» в диапазоне 0,1–1,0 мг/мл показывают дозозависимую эффективность по очистке ран от струпа (тканевого некроза). Коллагеназы благоприятно влияют на течение раневого процесса при ожогах и ранах, способствуют регрессии патологических рубцов кожи. Интенсивность разрушения избыточного коллагена в гипертрофических и келоидных рубцах имеет дозо-зависимый характер. Таким образом, применение растворов, содержащих 1 мг/мл коллагеназы эффективно и безопасно, и может быть использовано для лечения пациентов в амбулаторных условиях.

РЕГЕНЕРАЦИЯ КАК ЕСТЕСТВЕННОЕ ИНДУЦИРОВАННОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ?

Н.М. Парамонова^{1,2}, С.В. Чепур², А.В. Смирнова², Б.А. Парамонов³, А. Емельянова⁴, А.О. Шпаков¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: natapa@bk.ru

Ключевые слова: перепрограммирование, хроматин, цитоплазма, недифференцированные клетки, головной мозг, электронная микроскопия.

Современные технологии позволяют совершать самые разнообразные клеточные преобразования для достижения научных и практических целей. Так, для клонирования и получения генномодифицированных животных используют перенос ядер соматических клеток (SCNT, Somatic cell nuclear transfer) в ооциты того же вида организма [1]. Недостаток эффективности межвидового перепрограммирования пытаются ликвидировать различными химическими соединениями и их сочетанием на разных этапах подготовки клеток-реципиентов и развития эмбриона [2]. Японские исследователи разработали систему перепрограммирования фибробластов, которые получив фрагмент кольцевой ретровирусной ДНК, приобретали несвойственную им ранее устойчивость к высоким концентрациям неомицина [3]. В природе известны случаи естественной трансдетерминации (смены направления дифференцировки), вызванной не мутацией, а именно индукцией межклеточных взаимодействий. Подобные процессы обнаружены и в царстве растений, и животных организмов, в том числе и у человека. Примером могут служить главные клетки ЖКТ, клетки трахеи.

Занимаясь электронномикроскопическими исследованиями разных отделов головного мозга (неокортекс, белое вещество, перивентрикулярная зона и др.) при ряде нейро-дегенеративных состояний, травмах и вирусных поражениях мозга, нами описано явление потери деструктивно измененной цитоплазмы с «обнажением» поверхности ядер (нейронов и глии) от частичной до полной степени оголения. Хроматин в кариоплазме таких

ядер имел тенденцию перехода от гетерохроматиновых конденсатов к преобладанию эухроматина. Среди общей деструкции и на фоне нарушений ГЭБ изредка встречали небольшие, недифференцированные клетки с гомогенной кариоплазмой и малым количеством органелл в цитоплазме, чаще митохондрий. Впервые доложив о подобном явлении у людей с нормотензивной гидроцефалией, мы предположили, что наблюдаем дедифференцировку, «перепрограммирование» клеток нервной ткани, имеющее естественный адаптивный характер. Дальнейшие исследования, в том числе при экспериментах с культурой клеток (почечного эпителия) показали, что описываемое явление имеет системный механизм, вызываемый определенными условиями среды.

Литература:

1. Jullien J., et al. Nature reviews. Molecular cell biology. — 2011. — Vol. 12, no. 7. — P. 453–459.
2. Campbell K.H. Journal of anatomy. — 2002. — Vol. 200, no. Pt 3. — P. 267–275.
3. Yoshioka N., et al. Cell stem cell. — 2013. — Vol. 13, no. 2. — P. 246–254.

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМЕННО-ЭЛЕКТРОЛИТИЧЕСКОГО ОКСИДИРОВАНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ ИМПЛАНТАТОВ ИЗ ТИТАНОВЫХ СПЛАВОВ

Е.В. Парфенов¹, Л.В. Парфенова²

¹ ФГБОУ ВО Уфимский государственный авиационный технический университет, Уфа, Россия

² Институт нефтехимии и катализа ФГБУН УФИЦ РАН, Уфа, Россия

e-mail: evparfenov@mail.ru

Ключевые слова: титановые сплавы, сплавы с памятью формы, равноканальное угловое прессование, плазменно-электролитическое оксидирование, олигопептиды, биоактивные покрытия.

Разработка передовых постоянных имплантатов для ортопедических операций требует перехода на 4-е поколение устройств с «умными» поверхностями, взаимодействующими с клетками кости. Биомиметическая концепция предполагает применение имплантатов, имитирующих живые системы на всех уровнях: механическом, физическом, химическом и биологическом. Прим. тельно к постоянным имплантатам из титановых сплавов это требует снижения модуля упругости до уровня кости, формирования поверхностного слоя, близкого по физической морфологии, химическому и фазовому составу к кости, и обеспечения сигналинга клеток через биохимические механизмы.

В исследовании использовались сплавы: титан Grade 4, наноструктурный титан Grade 4, полученный методом равноканального углового прессования, и нового сплава с эффектом памяти формы Ti-18Zr-15Nb, модуль упругости которого ближе к параметрам кости по сравнению с титаном Grade 4. Формирование поверхностного слоя производилось с помощью плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО), зарекомендовавшего себя как надежный инструмент функционализации поверхности титановых имплантатов. Технология ПЭО позволяет получать пористые слои, физически имитирующие пористую структуру кости за счет действия микроразрядов,

как ключевой особенности механизма процесса. Кроме того, варьированием электролита можно добиться химического состава покрытия, близкого к человеческой кости, включающего фосфаты кальция и особенно гидроксипатит. Процесс ПЭО был оптимизирован для получения покрытий на всех используемых сплавах [1–3]. Обеспечение сигнального клеточного достигается за счет заполнения пор ПЭО-покрытия олигопептидами; трипептидная последовательность RGD (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота) была зафиксирована на поверхности с помощью бисфосфонатного линкера для улучшения биосовместимости имплантата [2]. Эффективность реализации биомиметического подхода была подтверждена исследованиями *in vitro* на клеточных линиях MG63, ФЛЭЧ и МСК [2, 3]. Такой подход формирует биомиметическую поверхность, которая повышает все аспекты биосовместимости имплантата и открывает возможность производства имплантатов 4-го поколения. Авторы благодарят Российский научный фонд за поддержку в рамках междисциплинарного проекта № 20-69-47029.

Литература:

1. Farrakhov R., Melnichuk O., Parfenov E. et al. *Coatings*. 2021. V. 11. P. 401.
2. Parfenov E., Parfenova L., Mukaeva V. et al. *Surf. Coat. Technol.* 2020. V. 404. P. 126486.
3. Parfenov E., Parfenova L., Dyakonov G. et al. *Surf. Coat. Technol.* 2019. V. 357. P. 669.

ОСТЕОГЕНЕЗ: РОЛЬ СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ Na/K-АТФАЗЫ

Н.А. Пасатецкая¹, Е.В. Лопатина^{1,2}

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

² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: npasatetckaia@yandex.ru

Ключевые слова: Na/K-АТФаза, катехоламины, органотипическая культура ткани, эксплантаты ткани кости.

Na/K-АТФаза поддерживает трансмембранный градиент ионов и участвует в модуляции процессов клеточного роста и пролиферации. Кардиотонические стероиды прямо регулируют активность фермента в норме и при патологии. Многочисленные данные свидетельствуют, что Na/K-АТФаза участвует в образовании мультимолекулярного сигнального комплекса с другими белками. Следовательно, изменение функциональной активности фермента может быть связано с рецептор-опосредованными эффектами со стороны вегетативной нервной системы и ряда других факторов. Участие сигнальной функции Na/K-АТФазы в регуляции остеогенеза изучено слабо.

Цель работы: изучить вклад сигнальной функции Na/K-АТФазы в модуляцию остеогенеза в эмбриональный период развития.

Исследование проводили на эксплантатах ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на коллагеновых подложках в питательной среде в CO₂-инкубаторе («Binder», Германия) в течение 3-х суток при 37 °С и 5% CO₂. В ходе работы исследовано 2500 эксплантатов ткани кости. Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава. В культуральную среду

экспериментальных чашек Петри добавляли оубаин, дигоксин, адреналин, норадреналин, пропранолол и урапидил в широком диапазоне концентраций. Полученные данные анализировали с использованием морфометрического метода и метода реконструкции оптических срезов. Морфометрический критерий — индекс площади — рассчитывали как отношение площади всего эксплантата к площади исходной зоны. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0, использовали t-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Часть работы выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Кардиотонические стероиды исследовали в диапазоне концентраций от 10⁻¹² до 10⁻⁶ М. В концентрации 10⁻¹⁰ М оубаин стимулировал рост эксплантатов ткани кости на 100%. Дигоксин трофотропного действия не проявил. В концентрации 10⁻⁶ М оубаин и дигоксин ингибировали рост эксплантатов ткани кости. Участие катехоламинов в остеоремоделировании исследовали в диапазоне концентраций от 10⁻¹⁰ М до 10⁻⁴ М. Ингибиторный анализ показал, что остеотоксическое действие катехоламинов в высоких концентрациях опосредовано активацией β₂-адренорецепторов. Норадреналин (10⁻⁶ М), в отличие от адреналина, стимулировал рост эксплантатов ткани кости на 36% через α₁-адренорецепторы. Норадреналин, но не адреналин, устранял ингибирующее действие оубаина (10⁻⁶ М), что свидетельствует о рецептор-опосредованной активации сигнальной функции Na/K-АТФазы.

АДГЕЗИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК 293Т НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСАХ РАЗЛИЧНОЙ МОРФОЛОГИИ

Т.Д. Пацаев¹, Е.В. Ястремский^{1,2}, А.М. Азиева¹, Д.А. Кириллова¹, А.А. Михуткин¹, К.Г. Антипова¹, Р.В. Шариков¹, Н.А. Шарикова¹, К.И. Луканина¹, Т.Е. Григорьев¹, Р.А. Камышинский², А.Л. Васильев^{1,2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН, Москва, Россия

e-mail: timpatsaev@mail.ru

Ключевые слова: НЕК 293 Т, полилактид (PLA), синтетический матрикс, растровая электронная микроскопия, флюоресцентная микроскопия, адгезия и пролиферация клеток.

Адгезионные и пролиферативные свойства матриксов — каркасов, обеспечивающих механическую стабильность и стимулирующих рост клеток — играют существенную роль в тканевой инженерии и во многом зависят от химических и структурных особенностей их поверхности. В то же время морфология матриксов — важный фактор, влияющий на рост и развитие клеток и последующее формирование ткани [1].

В настоящей работе исследовано влияние морфологически различных полилактидных матриксов на адгезию и пролиферацию культивируемых на них клеток линии НЕК 293Т при посадке, через два и пять дней. Для исследований были выбраны матриксы следующих типов: ориентированные и неориентированные матриксы губок и нетканых материалов, а также плёнки, обладающие существенно различным рельефом поверхности.

Для определения уровня адгезии и пролиферации клеток использовалась флуоресцентная и растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды. Исследования показали, что на обоих губчатых матриксах клетки прикрепилась в большем количестве, но с низким процентом живых клеток, пролиферация в промежутке между двумя и пятью сутками была низкой. Максимальной пролиферация была на губчатом неориентированном матриксе. Лучше всего клетки делились на плёночном матриксе. Выживаемость клеток падала на всех матриксах, меньше всего она упала у клеток на нетканом неориентированном матриксе.

Работа была проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 21-13-00321 «Деформационное поведение биоразлагаемых матриксных различного типа при механических нагрузках»).

Литература:

1. Cortizo M.S. Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering. Industrial Applications of Renewable Biomass Products. — 2017. — p. 47–74.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛИНА В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ MDM2

**Н.В. Первушин¹, Д.Р. Базанов², В.Ю. Савицкая²,
Е.В. Савин¹, Н.А. Лозинская², Г.С. Копейна¹**

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

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: rhododendron.nick@mail.ru

Ключевые слова: онкология, таргетная терапия, p53, MDM2, апоптоз, производные имидазолина.

По данным ВОЗ, онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности в мире. Важную роль в процессе опухолевого перерождения играет транскрипционный фактор p53. Этот белок выполняет функцию онкосупрессора и регулирует различные процессы, включая клеточное деление, клеточное старение, запуск программируемой гибели клеток (ПГК). Мутации в гене *TP53*, встречающиеся примерно в 50% опухолей, приводят в большинстве случаев к потере функциональной активности белка p53 и прогрессированию онкологического заболевания. Главным регулятором белка p53 является убиквитин-лигаза MDM2, которая за счет различных механизмов обеспечивает низкий уровень p53 в клетках в норме. Нарушение взаимодействия MDM2 с p53 ведет к накоплению последнего, что впоследствии приводит в раковых клетках к p53-индуцибельной активации транскрипции генов проапоптотических белков и запуску ПГК по типу апоптоза. В настоящее время несколько препаратов из группы нутлинов — таргетных ингибиторов MDM2, относящихся к производным имидазолина, — являются перспективным направлением в лечении опухолей, содержащих p53 дикого типа, и проходят клинические испытания.

В настоящей работе была изучена биологическая активность различных производных имидазолина в сравнении с Нутлином-3а и его модификациями — RG7112 и RG7388. Компьютерное моделирование показало, что исследуемые соединения способны эффективно связываться с MDM2 в сайте, отвечающим за его взаимодействие с p53 [1–3]. Кроме того, полученные

соединения обладали более высокой растворимостью в отличие от референсных препаратов [2]. В ходе дальнейшего анализа было выявлено, что наибольшей биологической эффективностью в различных опухолевых моделях *in vitro* (колоректальный рак, нейробластома, остеосаркома и др.) обладают орто- и пара-производные имидазолина (2,4 — diMeO) [1], а также их модификации [3], в том числе сульфопроизводные [2]. Данные соединения вели к эффективной стабилизации p53 [1–3] и p53-индуцибельных белков (p21, puma) в указанных моделях рака [2,3] и в наномолярных концентрациях обладали эффективностью, сравнимой с Нутлином-3а [2,3]. Анализ клеточной гибели продемонстрировал, что полученные вещества практически не приводили к запуску клеточной гибели в широком диапазоне концентраций, что аналогично действию Нутлина-3а и его производных [1–3]. Таким образом, исследуемые производные имидазолина могут быть рассмотрены в качестве новых ингибиторов MDM2. Работа была поддержана грантами РФФИ (17-75-20102) и Минобрнауки (075-15-2020-789).

Литература:

1. Bazanov D.R., Pervushin N.V. et al. Bioorg Med Chem Lett. 2019. V. 29. P. 2364–2368
2. Bazanov D.R., Pervushin N.V. et al. Medicinal Chem. Res. 2021. V. 30. P. 2216–2227
3. Bazanov D.R., Pervushin N.V. et al. Pharmaceuticals. 2022. V. 15. P. 444.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛАМИН-АССОЦИИРОВАННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ НА МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

**К.И. Перепелина^{1,2}, А.К. Зайцева^{1,3},
А.А. Худяков¹, И.Э. Неганова²,
А.А. Костарева¹, А.Б. Малашичева^{1,2}**

¹ ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: perepelina.kseniya93@gmail.com

Ключевые слова: Ламин А/С, мутации в гене *LMNA*, ламинопатии, кардиомиопатии, дифференцировка клеток, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, сердечный натриевый канал Nav 1.5.

Ламинопатии представляют собой широкую группу заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене ламина А/С (*LMNA*). Клинические фенотипы ламинопатий крайне разнообразны и включают кардиомиопатию, миопатию и миодистрофию, нарушения ритма, поражение центральной и периферической нервной системы. Понимание механизмов функционирования ламинов, а также их роли при развитии сердечных патологий при мутации в гене *LMNA* представляется крайне актуальным в связи распространенностью данной группы заболеваний. Несмотря на большую актуальность данных исследований, механизмы, посредством которых ядерные ламины вызывают развитие ламин-ассоциированных кардиомиопатий остаются нераскрытыми. Не изученными являются основы дисфункции ионных каналов при ламинопатиях.

Предлагаемый проект направлен на изучение экспрессионного профиля и функционирования сердечного натриевого канала Nav1.5 в кардиомиоцитах, полученных путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациента с *LMNA* R249Q мутацией. Изменение свойств кардиомиоцитов с мутацией изучали с помощью метода ПЦР в режиме реального времени на основные кардиоспецифичные маркеры. Функционирование сердечного натриевого канала Nav 1.5 исследовали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp).

Мы продемонстрировали, что мутация *LMNA* R249Q приводит к дисрегуляции экспрессии генов в кардиомиоцитах, полученных из ИПСК: наблюдалось повышение экспрессии генов, кодирующих структурные белки в кардиомиоцитах с *LMNA* R249Q; в то же время мутация *LMNA* R249Q приводила к подавлению экспрессии генов, кодирующих белки десмосом. Кроме того, мы показали, что кардиомиоциты, полученные из ИПСК с *LMNA* R249Q мутацией, характеризуются изменениями в функционировании потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.5, что может рассматриваться как вероятный механизм развития аритмии.

Таким образом, изучение эффекта ламиновых мутаций на экспрессионный профиль и электрофизиологические свойства кардиомиоцитов представляется весьма актуальным как с точки зрения фундаментальной биологии, так и с точки зрения практического применения. Исследование поддержано грантом Президента поддержки научных школ № НШ-4664.2022.1.4.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕССЫ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Д.А. Переплетчикова¹, Д.А. Костина¹,
И.А. Хворова¹, В.В. Карелкин²,
А.А. Лобов¹, А.Б. Малашичева¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² РНИИТО им. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: dasha_perepletch@mail.ru

Ключевые слова: эндотелий, мезенхимные стволовые клетки, остеогенная дифференцировка, Notch.

Известно, что процессы ангиогенеза и остеогенеза неразрывно связаны, а взаимодействие эндотелия и мезенхимы необходимо для нормальной оссификации. Однако до сих пор относительно мало известно о непосредственной роли эндотелия в процессах остеогенной дифференцировки и о конкретных механизмах, лежащих в ее основе.

Для изучения клеточных и молекулярных механизмов остеоиндуктивных и/или остеосупрессивных свойств эндотелия, мы провели эксперименты в остеогенных условиях в системе бесконтактного сокультивирования и при непосредственном контакте двух типов клеток: первичной культуры остеобластов и эндотелиальных клеток пупочного канатика человека. После контактного сокультивирования смешанную культуру разделяли методом магнитного сортирования по эндотелиальному маркеру CD31. Далее проводили комплексный анализ изменений протеомного и транскриптомного профилей отдельно для остеобластов и эндотелиальных клеток (ЭК) при различных условиях культивирования. Методом РВ-ПЦР, оценивали уровень экспрессии генов интереса. Эффективность остеогенной дифференцировки оценивали по уровню минерализации внеклеточного матрикса.

Было выявлено, что эндотелий одновременно обладает как остеоиндуктивными, так и остеосупрессивными свойствами. Условия сокультивирования оказывали противоположные эффекты на остеогенную дифференцировку остеобластов — контактное культивирование усиливало, а бесконтактное подавляло. Для статистического анализа протеомных данных использовали 3073 белка для ЭК и 2966 для остеобластов. В ходе транскриптомного анализа получили количественную информацию о транскриптах, соответствующих 38552 генам. По результатам анализов мы выявили слабые изменения в физиологии остеобластов, но определили существенные изменения в физиологии ЭК. Так, при сравнении контрольных и экспериментальных ЭК нам удалось выявить значительные различия в экспрессии белков и транскриптов, связанных с фокальными контактами и организацией внеклеточного матрикса. При помощи РВ-ПЦР было установлено, что при контактном и бесконтактном сокультивировании наблюдается активация экспрессии Notch-зависимых генов: HEY1, DLL4, JAG, SNAIL, SLUG и маркера остеогенной дифференцировки RUNX2.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что эндотелий оказывает двойственное влияние на процессы остеогенной дифференцировки. Остеоиндуктивные свойства эндотелия опосредованы сигнальным путем Notch и реализуются только при наличии физического контакта с остеобластами, а остеосупрессивные свойства связаны с действием паракринных факторов, секретируемых ЭК. При этом, сокультивирование с остеобластами оказывает существенное влияние на сам эндотелий и, вероятно, на его секреторный профиль. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-14-00152.

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ ПОСЛЕ ОЖОГОВЫХ ТРАВМ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

П.В. Перетягин, А.Г. Соловьева, Н.Л. Короткова,
Н.В. Диденко, К.Л. Беляева, В.И. Загреков

¹ ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

e-mail: peretyaginpv@gmail.com

Ключевые слова: гипербарическая оксигенация, микроциркуляция, ожоги.

Известно, что при обширных ожогах в качестве одного из основных методов лечения последствий ожогов является использование местной кожной пластики. Одним из основных условий успешного приживления трансплантата является его кровоснабжением по микрососудам [1]. Оно может быть успешно стимулировано различными физическими факторами, в том числе проведением курса гипербарической оксигенации (ГБО) [2]. Целью исследования — изучение динамики показателей микроциркуляции в кожных лоскутах при проведении процедур ГБО.

Материалы и методы. В исследование было включено 15 пациентов (38 кожных лоскутов). После операции с использованием рубцовых лоскутов оценивали состояние микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии. Всем пациентам с учетом показаний были назначены сеансы ГБО в режиме 1,3 АТА (7 процедур, время изопреции — 40 мин).

Результаты. Показано, что прирост показателя микроциркуляции в ответ на процедуру ГБО-терапии

свидетельствует о наличии достаточных резервов микроциркуляции и может быть использован как прогностический показатель выживания сомнительного участка кожного лоскута. Возрастание показателя микроциркуляции в дистальном отделе лоскута после ГБО указывает на целесообразность его применения в реконструктивной хирургии последствий ожогов для профилактики развития ишемических нарушений в рубцовом кожном лоскуте. После проведения курса ГБО-терапии послеоперационный период протекал с формированием линейного некроза, что является особенностью заживления в рубцово-измененных тканях, однако образования некрозов, повлиявших на результат оперативного лечения и потребовавших проведения повторной кожной пластики, не наблюдали.

Литература:

1. Yamazaki F., Takahara K., Sone R., Johnson J.M.J. Appl. Physiol. 2007; 103: 2026–2033.
2. Stirban A., Lentrecht S., Nandrea S. et al. Undersea and Hyperbaric Medicine. 2009; 36 (5): 381–390.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОМА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Н.А. Петинати¹, Н.И. Дризе¹, Г.П. Арапиди², В.О. Шендер², М.А. Лагарькова², Л.А. Кузьмина¹, Е.Н. Паровичникова¹, В.Г. Савченко¹

¹ ФГБУ НЦМИ гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

e-mail: loel@mail.ru

Ключевые слова: Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; трансплантация костного мозга, секретом, рецидив острого лейкоза.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), полученные от донора гемопоэтических стволовых клеток, вводили внутривенно пациентам после трансплантации аллогенного костного мозга в момент восстановления числа лейкоцитов до 109/л. МСК вводили для предотвращения развития острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). При ретроспективном изучении эффективности введения МСК оказалось, что нет достоверных отличий в частоте развития РТПХ между группами пациентов, которым вводили и не вводили МСК. Многофакторный анализ показал, что после введения МСК достоверно увеличивается общая выживаемость пациентов и уменьшается частота рецидивов. Целью работы было проанализировать отличия в составе белков, секретируемых МСК, в зависимости от последующего развития рецидива основного заболевания у больных.

В работе был проанализирован секретом 5 образцов МСК, введенных пациентам у которых впоследствии не было рецидива (МСК-к) и 5 образцов МСК, введенных пациентам, у которых впоследствии развился рецидив (МСК-Р). Секретом МСК включал белки, секретируемые в составе везикул и экзосом. Анализ белков проводили на масс-спектрометре TripleTOF 5600+. Для

характеристики идентифицированных белков использовали онлайн-сервис STRING-db и базу данных GO. Из 1841 проанализированных белка 443 не секретиrowались МСК-к, 171 белок секретиrowали только МСК-к. Среди них белки, относящиеся к внеклеточному пространству: TCN2, NOTCH2, LIPG, CDH11, ALB, CYTL1, CTSF, CASP3, GREM2, PTTG1P, V7RP1, CETN2, COL4A3. 450 белков слабее секретиrowаны МСК-Р по сравнению с МСК-к. К слабо секретиrowаемым белкам относятся 8 белков, участвующий в регуляции ответа на цитокины (GAS6, HPX, UBE2K, PAFAN1B1, DHX9, MAVS, CPNE1, SPPL2A) и в ангиогенезе. Среди них рецепторы к факторам роста PDGFRA и PDGFRB, NOTCH3-рецептор к белку NOTCH, TGFBI, участвующий в адгезии, и другие.

548 белков сильнее секретиrowаны в МСК-Р. Среди них большой кластер объединяет связанные с адгезией клетки к субстрату, активацией, связыванием с ростовыми факторами и коллагеном.

Показано, что между секретомом МСК пациентов, у которых рецидив развился в течение полугода после их введения (ранний рецидив — МСК-РР) и пациентов, у которых рецидив развился позже 2-х лет (поздний рецидив — МСК-ПР) существует большая достоверная разница. Выявлены отличия в количестве секретиrowаемых белков между МСК-к, МСК-РР и МСК-ПР. Несмотря на то, что МСК быстро элиминируются из организма после внутривенного введения и секретом МСК сильно варьирует у доноров, секретиrowаемые белки влияют на дальнейшую судьбу пациента. Среди выявленных различающихся белков могут быть ключевые факторы, повлиявшие на развитие рецидива. Эти белки могли повлиять как на оставшиеся опухолевые клетки, так и на костномозговую нишу, регулирующую кроветворение и стволовые клетки опухоли. Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-29-040-23.

ИЗУЧЕНИЕ IBA-1-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ НАЛОЖЕНИЯ ЛИГАТУРЫ И СУБПЕРИНЕВРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК

Е.С. Петрова, Е.А. Колос

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: iempes@yandex.ru

Ключевые слова: нерв, регенерация, белок Iba-1, макрофаги, МСК.

Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) может способствовать регенерации нерва [1, 2]. Вопрос о влиянии экзогенных МСК на репаративные процессы, происходящие в нервном стволе в ранние сроки после травмы, мало изучен. Субпериневральная трансплантация МСК является удобной моделью для изучения межклеточных коммуникаций, происходящих в нерве после повреждения. Цель настоящей работы — исследование распределения популяции макрофагов в седалищном нерве крысы после травмы и однократной трансплантации МСК. МСК костного мозга крыс Вистар-Киото были получены в ООО «Трансхнологии» (руководитель к.б.н. Д.Г. Полицев). Седалищные нервы крыс Вистар-Киото ($n=12$) повреждали (лигатура, 40 с), что приводило к развитию валлеровской дегенерации (ВД) в дистальном сегменте нерва [3]. Части животных субпериневрально вводили суспензию МСК (5×10^4 клеток в 5 мкл). Через 7 сут исследовали популяцию макрофагов, содержащих

кальций-связывающий белок Iba-1 (маркер фагоцитирующих клеток) [4]. На срезах через дистальный сегмент нерва реципиента определяли площадь, занимаемую Iba-1⁺ клетками. Показано, что в интактном нерве идентифицируются отдельные Iba-1⁺ резидентные макрофаги. Через 7 сут после наложения лигатуры в дистальном сегменте нерва резко увеличивается количество макрофагов. Это наблюдение подтверждает известный факт повышения числа гематогенных макрофагов, которые участвуют в процессах ВД после повреждения нерва. Нами было проведено сравнительное исследование площади, занимаемой иммунореактивными клетками в группе крыс с лигатурой и в группе крыс, которым после наложения лигатуры трансплантировали МСК. Оказалось, что однократное введение суспензии МСК приводит к снижению количества Iba-1⁺ макрофагов. Полученные данные свидетельствуют об изменении процессов ВД в нерве реципиента после однократной субпериневральной трансплантации МСК и требуют дальнейшего углубленного изучения.

Литература:

1. Siemionow M., Strojny M.M., Kozłowska K. et al. *Stem Cell Rev Rep.* 2021. V.18. P. 642–659.
2. Lavorato A., Raimondo S., Boido M. et al. *Int J Mol Sci.* 2021. V. 22. P. 572.
3. Petrova E.S., Kolos E.A. *Neurosci Behav Physiology.* 2021. V. 51. P. 513–518.
4. Kolos E.A., Korzhhevskii D.E. *Acta Naturae.* 2020. V.12(1). P. 4–17.

ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНОГО ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА, ОБОГАЩЕННОГО ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ, НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОГЛИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МИНИ-СВИНЕЙ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

В.П. Петрова, А.Р. Сираева, И.И. Гайнуллин, Р.Х. Ахметов, И.С. Миняева, К.Р. Яппарова, Д.А. Трофимов, В.А. Маркосян, Р.Р. Исламов, З.З. Сафиуллин

ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

e-mail: andrei.izmaylov@kazangmu.ru

Ключевые слова: аутологичный лейкоконцентрат, генная терапия, ишемический инсульт, мини-свинья, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM).

Естественные ограничения регенерации в ЦНС остаются основной проблемой при лечении неврологических заболеваний, в том числе ишемических инсультов головного мозга. Среди активно разрабатываемых способов предупреждения развития постишемических негативных последствий является доставка в мозг терапевтических генов, кодирующих нейропротекторные молекулы. Цель исследования — оценить влияние аутологичного генетически обогащенного лейкоконцентрата (ГЛ), продуцирующего рекомбинантные сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), на ремоделирование нейроглии в перинфарктной области головного мозга через 21 сут после моделирования ишемического инсульта у мини-свиней.

Вьетнамские вислобрюхие мини-свиньи (25–30 кг) были разделены на три группы: (1) контрольные (n=3), опытные (n=3) и интактные (n=3) животные. Контрольным и опытным животным моделировали ишемический инсульт путем окклюзии средней мозговой артерии. Через 4 часа после операции мини-свиньям из опытной группы внутривенно вводили аутологичный ГЛ, трансдуцированный аденовирусными векторами (Ad5/F35), несущими гены *veg165*, *gdnf* и *ncam1*, а животным из контрольной группы — аутологичный нативный ГЛ. Через 3 недели после моделирования инсульта животных вводили в глубокий наркоз. Головной мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4% забуференном растворе параформальдегида. Из перинфарктной области готовили замороженные срезы толщиной 20 мкм. Постишемические изменения астроцитов, олигодендроцитов и клеток микроглии изучали с использованием специфических антител к GFAP, Olig2 и Iba1, соответственно, на площади 0,5 мм².

Иммунофлуоресцентный анализ астроцитов выявил увеличение площади GFAP-положительной площади в контрольной группе [5,48 (4,89–6,26)], по сравнению с опытной [3,51 (2,35–4,86)] и интактной [3,95 (3,25–4,50)] группами. Количество миелообразующих Olig2-позитивных клеток было снижено в контрольной группе [52,00 (48,50–52,50)], по сравнению с интактной группой [62,00 (60,50–74,50)]. Количество Olig2-позитивных клеток в опытной группе [55,00 (52,50–58,00)] не отличалось от интактных значений. Анализ клеток микроглии показал увеличение Iba1-позитивной площади у контрольных [17,53 (15,50–18,44)] и опытных [13,09 (12,55–13,57)] животных, при сравнении с интактными [3,35 (2,85–3,64)] мини-свиньями.

Полученные нами данные свидетельствуют, что внутривенное введение аутологичного ГЛ, продуцирующего рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, через 4 часа после моделирования ишемического инсульта поддерживает развитие астроглиоза и поддерживает миелинизацию нервных отростков в перинфарктной области мозга. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 19-75-10030.

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ТКАНЯХ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ КОЖИ КРЫС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МАЗИ С НОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ N-АЦЕТИЛАМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ

М.А. Петровская, М.Б. Петрова, Е.В. Андрианова, Е.Н. Егорова

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, Тверь, Россия

e-mail: solm1990@mail.ru

Ключевые слова: регенерация тканей, термические ожоги кожи, производное ацетсамовой кислоты, фактор некроза опухоли альфа, трансформирующий фактор бета.

В эксперименте изучалось использование нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты (N-ацетил-6-АК) при заживлении ожоговых ран кожи площадью 225 мм². Методом иммуноферментного анализа определяли уровни цитокинов, ассоциированных с воспалением — фактора некроза опухоли альфа (TNFα) и трансформирующего фактора бета (TGFβ) в гомогенатах регенерирующих тканей с помощью тест-систем

«Bender MedSystems GmbH» (Австрия) «Rat TNF alpha» и «Rat TGF beta 1» соответственно. Крысы были разделены на 4 группы. В интактной группе ожог не моделировали, в опытной ежедневно на дефект наносили 2% мазь с N-ацетил-6-АК, в контрольной группе 1 обработка ран не проводилась, в контрольной группе 2 наносилась мазевая основа. Планиметрический анализ и иммунологические исследования проводили на 7, 14, и 21 сутки эксперимента.

Установлено, что концентрации TNF α и TGF β у животных всех групп в регенерирующих тканях в ходе заживления были достоверно повышены по сравнению с интактными крысами [1, 2]. Содержание TNF α на 7 сутки (фаза воспаления) на 20,7% и 28,3% было ниже, чем в контрольных группах 1 и 2 соответственно (оба $p < 0,05$). На 14 сутки исследования (фаза пролиферации) уровень TNF- α во всех группах снизился на порядок и его различия между животными изучаемых групп были недостоверны. На 21 сутки (фаза эпителизации) концентрация TNF- α статистически значимо снизилась у крыс всех групп с ожогами по сравнению с предыдущей фазой, но достоверно не различалась между группами.

Уровень TGF β по мере заживления ожогов достоверно снижался и на 7 сутки в опытной группе был выше на 27,5% и 22,4%, а на 14 сутки — на 35,0% и 22,9%, чем в контрольных группах 1 и 2 соответственно (все $p < 0,05$). На 21 сутки концентрация TGF β статистически значимо снизилась у животных всех групп по сравнению с предыдущим сроком наблюдения и не различалась достоверно между группами.

Планиметрическая оценка также подтвердила прорегенераторный потенциал нового производного N-ацетил-6-АК: у крыс опытной группы заживление ожогового дефекта осуществлялась в среднем на 2,2 суток ранее в сравнении контрольными группами.

Литература:

1. Li Y., Xu D.B., Wang H.J. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 2016. 32(7). 408–412.
2. Al-Gareeb A., Gorial F., Mahmood A. Arch Rheumatol. 2019. 34(4). 426–433.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА РЕПАРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИРОЦИТОВ ПОСЛЕ ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Д.А. Пешкова^{1,2}, Е.С. Головнева^{1,2}, Д.Р. Соляникова²

¹ ГБУЗ Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

e-mail: da.peshkova@outlook.com

Ключевые слова: лазер, щитовидная железа, тироциты, тучные клетки, старение.

Процессы пролиферации и регенерации тканей регулируются при взаимодействии нервной, иммунной и эндокринной систем. Тучные клетки (ТК) являются уникальными тканевым биосенсором, который замыкает на себя все эти звенья. Благодаря широкому спектру медиаторов, ферментов, цитокинов и факторов роста ТК активно влияют на пролиферацию, синтетические

возможности клеток, ангиогенез и микроциркуляцию в развитии защитно-приспособительных и компенсаторных реакций [1]. В щитовидной железе интенсивность регенеративных процессов снижается с возрастом, вплоть до развития старческого гипотиреоза, связанного с не только с местными изменениями, но и нарушениями в работе оси гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа. Одним из способов стимуляции регенерации является инфракрасное лазерное воздействие, приводящее к активации Ca²⁺-зависимых процессов в клетках [2], к которым относится и экзоцитоз гранул ТК [1].

Целью исследования являлось изучение возрастных особенности влияния тучных клеток на репаративные изменения тироцитов после инфракрасного лазерного воздействия.

Эксперимент проведен на 96 крысах Вистар. Изучались эффекты однократного воздействия инфракрасным лазером на щитовидную железу молодых и старых животных. Сроки выведения из опыта 1 час, 1, 3, 7 суток. Гистологические препараты щитовидной железы анализировались морфометрически.

Однократное лазерное воздействие на область щитовидной железы молодых животных приводило к миграции ТК в строму органа, увеличению количества клеток и повышению их секреторной активности начиная со срока 1 час. Фолликулярный эпителий отзывался пролиферативными изменениями и повышением функциональной активности на протяжении всего эксперимента. У старых животных после лазерного воздействия происходила активная дегрануляция ТК на 3 и 7 сутки и кратковременное (до 3-х суток) повышение функциональной активности тироцитов. Корреляционный анализ выявил прямые сильные связи между морфофункциональными показателями тучных клеток и тироцитов.

Новые данные о зависимости реакции ТК после лазерного воздействия от возраста животного, и влиянии этих изменений на фолликулярный эпителий подтверждают необходимость индивидуального подбора режимов лазерного воздействия.

Литература:

1. Смелова И.В., Головнева Е.С. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. № 3. С. 67.
2. Москвин С.В., Кочетков А.В. Эффективные методики лазерной терапии М. — Тверь: Издательство «Триада», 2016. 80 с.

ОСТЕОИНДУКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ФОТООТВЕРЖДАЕМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФИБРОИНА ШЕЛКА

Е.С. Пигусова¹, А.К. Судьина¹, А.А. Рамонова¹, А.Ю. Архипова^{1,2}, В.Г. Богуш³, И.В. Бессонов¹, К.В. Шайтан¹, А.М. Мойсенович¹

¹ Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ, Шэньчжэнь, Китай

³ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: ekaterinapigusova@mail.ru

Ключевые слова: тканевая инженерия, метакрирированный фиброин шелка, регенерация костной ткани.

Дефекты костной ткани могут образовываться как следствие травм, операций и остеодегенеративных заболеваний. Для восстановления функций и структуры

костной ткани требуется заполнение дефектов остеопластическими материалами, обеспечивающими каркас для восстановления ткани и обладающими остеоиндуктивными свойствами.

Композитные материалы на основе смеси структурных белков шелка и желатина успешно применяются в регенеративной медицине уже на протяжении нескольких лет, благодаря своим превосходным свойствам. Получение фотоотверждаемых производных фиброина и желатина дополнительно улучшает их физико-химические свойства, так изделия на основе метакрилизованного фиброина (ФБМА) характеризовались 10-кратным увеличением его жесткости, а фотосшивание желатина (ЖМА) приводило к стабилизации структуры в водных растворах [1]. Правильно подобранное соотношение ФБМА и ЖМА может помочь создать эффективные скаффолды, обладающие максимальной прорегенеративной и остеоиндуктивной активностью.

В данной работе получали фотоотверждаемые композитные пленки с разным соотношением ФБМА и ЖМА и изучали возможность их применения для восстановления костной ткани. Полученные пленки успешно поддерживали жизнеспособность и остеогенную дифференцировку клеток. Стоит отметить, что наилучшие показатели наблюдали у образцов с соотношением ФБМА/ЖМА 7:3, на которых наблюдалось увеличение количества клеток, усиление остеоиндуктивной активности, а именно повышение уровня экспрессии щелочной фосфатазы и отложение клетками фосфатов кальция. Что интересно, эти результаты не коррелировали с повышением экспрессии RGD-зависимых субъединиц интегринов $\beta 1$ и $\alpha 5$, и максимальный уровень их экспрессии наблюдался на подложках с наибольшей жесткостью на основе чистого ФБМА.

Таким образом, создание композитных субстратов с соотношением компонентов ФБМА/ЖМА 7:3 приводит к улучшению остеогенных свойств материалов и делает возможным их применение в фотолитографии и для изготовления персонализированных имплантатов. Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Bessonov I., Moysenovich A., Arkhipova A. et al. Polymers (Basel). 2020. V. 12. № 3. P. E646.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА КОСТИ В ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ ОСТЕОРЕЗОРБЦИИ

Е.В. Писарева¹, М.Ю. Власов², Л.Т. Волова², Е.В. Тимченко¹, А. Тчанг¹, И. Лемба¹

¹ Самарский университет, Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

e-mail: pella1@rambler.ru

Ключевые слова: остеорезорбция, минеральный костный компонент, костный метаболизм.

Поиск новых биотехнологических продуктов и способов их применения для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушением регуляции костного метаболизма является актуальным направлением регенеративной медицины в настоящее время.

В биотехнологическом центре «БиоТех» СамГМУ совместно с Самарским университетом разработана

технология получения и предложен способ введения в организм минерально-органического компонента костной ткани (МКК) аллогенного происхождения, получаемого после производства имплантатов из утилизируемых костных фрагментов [1,2]. Кальций-фосфатные резорбируемые материалы обладают остеоиндуктивностью, могут служить носителями лекарств и использоваться для неинвазивных методов лечения костной ткани. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение состава и физико-химических свойств МКК и его исследование в различных патогенетических моделях остеорезорбции у животных.

Химический состав и размер частиц в образцах МКК человека и животных изучены методами рамановской спектроскопии, рентгенофлуоресцентного, рентгенофазового, лазерно-дифракционного и протеомного анализа. Безопасность и эффективность биоматериала изучена в эксперименте на крысах, кроликах и свиньях в гипострогенной, глюкокортикоидной и гипертермической моделях. В сыворотке крови определяли биохимические показатели костного метаболизма, проводили гистологические исследования костной ткани и жизненно-важных органов.

Установлено, что аллогенный МКК содержит микроэлементы костной ткани человека, а кристаллическая фаза соответствует гидроксипатиту. Протеомный анализ выявил коллагеновые и не коллагеновые белки, что было подтверждено спектроскопией комбинационного рассеяния.

При внутримышечном введении МКК интактным животным не выявлено патологических изменений со стороны жизненно важных органов, отложений кальциатов в тканях, отклонений гомеостаза. Имплантация биоматериала способствует снижению активности остеокластов, усилению синтеза коллагена остеобластами, снижению интенсивности остеорезорбции. Устраняется остеодеструктивный эффект глюкокортикоидов, наблюдается нормализация процессов ремоделирования. Полученные результаты могут служить основой для рекомендации к завершению доклинических испытаний аллогенного МКК и дальнейшему его применению в клинической практике для профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушением метаболизма костной ткани.

Литература:

1. Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Власов М.Ю. Пат. РФ № 2219933. кл. А61К33/00, А61Р19/10. 2003.
2. Волова Л.Т., Писарева Е.В., Власов М.Ю. и др. Пат. РФ № 2704114. кл. А61К 35/32. 2019.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАГНИЕВЫХ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ СПЛАВОВ СИСТЕМ Mg-Zn-Ga И Mg-Zn-Mn-Ca

С.В. Плегунова

НИТУ МИСиС, Москва, Россия

e-mail: Sofa.plegunova@gmail.com

Ключевые слова: биорезорбируемые материалы, магний, ортопедические имплантаты, биосовместимость, цитотоксичность, коррозионная стойкость.

Современная медицина широко использует искусственные материалы, предназначенные для замены поврежденных тканей. Магний и его сплавы имеют ряд

преимуществ по сравнению с обычными материалами для ортопедических имплантатов, такими как нержавеющая сталь, титан и его сплавы, керамика и биорезорбируемые полимеры [1,2]. Основные области применения медицинских изделий на основе магния в настоящее время включают сердечно-сосудистые стенты, штифты для фиксации костей, а также винты. Материалы для имплантатов с механическими свойствами близкими к костным, могут вовлекать окружающую костную ткань в нагрузочные процессы и тем самым снижается возможность расшатывания крепления имплантата [2]. Сплавы магния считаются перспективными заменителями постоянных имплантатов из-за их биорезорбции в физиологической среде, что исключает повторное хирургическое вмешательство.

В настоящей работе исследована биосовместимость магниевых сплавов Mg-Zn-Ca-Mn и Mg-Zn-Ga, с организмом человека для применения в качестве материала для имплантатов, используемых при остеосинтезе. Было показано, что сплавы после горячей экструзии демонстрируют хорошие механические свойства и низкую скорость коррозии в растворе Хэнкса. Для исследования концентрации элементов экстрактов использовался метод атомно-эмиссионной спектрометрии. Концентрация элементов увеличивается по линейной зависимости с увеличением времени выдержки сплава в среде DMEM/F12. Концентрации химических элементов в экстрактах, полученных из сплавов, находятся в предельно допустимых значениях для организма человека.

In vitro цитотоксичность экстрактов была исследована методом МТС-теста на клеточной линии MG63 в соответствии с ISO 10993-5. Высокая цитотоксичность достигается только для 100% экстракта (без разбавления) причиной высокий pH клеточной среды жизнеспособность клеток снижена до 60%. В процессе раститровки 50, 25 и 12,5% клеточной среды заменялось на экстракт, что способствовало увеличению жизнеспособности клеток от 85%.

Цитотоксического действия сплавов на клетки MG63 не наблюдалось, и в сочетании с механическими и коррозионными свойствами эти сплавы подходит для применения в медицине.

Литература:

1. С.Л. Синебрюхов. Запорожский медицинский журнал. — 2013. — Т. 6. — № 81. — С. 76–79.
2. Witte F. Acta Biomaterialia. — 2010. — Vol. 6. — № 5. — P. 1680–1692.

РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ АВТОМАТИЧЕСКОГО ПОДСЧЕТА КЛЕТОК

Н.С. Покровский, М.А. Водякова, Е.В. Мельникова

ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: pokrovsky.ns@gmail.com

Ключевые слова: валидация, счетчик клеток, гемоцитометр, жизнеспособность, экспертиза качества.

Разработка и производство продуктов, содержащих в своем составе жизнеспособные клетки человека, требует поддержания определенных параметров качества и безопасности на протяжении всего процесса. К таким параметрам относятся жизнеспособность, а также минимально необходимое количество клеток. Контроль этих показателей обеспечивает точный подбор дозы для

достижения безопасности и эффективности выпускаемого продукта.

Традиционный способ подсчета клеток и оценки их жизнеспособности подразумевает использование красителей (например, трипановый синий) и гемоцитометра. Такой метод является золотым стандартом в первую очередь из-за его низкой стоимости, универсальности и простоты. Однако использование гемоцитометра имеет существенные недостатки (особенно для масштабных производств), такие как трудоемкость и высокая длительность процесса подсчета и пробоподготовки. Кроме того, непосредственное участие оператора в процессе подсчета вносит существенный вклад в повышение коэффициента вариации, а также требует большого количества сотрудников для параллельного подсчета нескольких образцов.

Автоматические счетчики клеток (такие как Cedex (Roche, Швейцария), Countess II (Invitrogen, США), Vi-CELL XR (Beckman Coulter, США) и другие) позволяют преодолеть ограничения традиционных ручных методов, снижая трудозатраты и повышая точность подсчета путем автоматизации процесса и исключения человеческого фактора.

Для валидации методики автоматического подсчета клеток согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV необходимо определять такие параметры, как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность для общего количества клеток и процента жизнеспособности. В настоящее время в научной литературе представлены единичные публикации, описывающие подходы к валидации методик подсчета клеток в автоматическом режиме с использованием счетчиков клеток. Изучив представленные литературные данные, а также нормативную документацию, в рамках этой работы была разработана стратегия валидации методики автоматического подсчета клеток, заключающаяся в разработке дизайна эксперимента, подборе стандартов, экспериментальных точек и установлении критериев приемлемости для оценки полученных результатов. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В АСПЕКТЕ ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РУБЦА МАТКИ

А.Г. Полешко¹, С.И. Михалевич², С.А. Креер², И.Д. Волотовский¹

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

e-mail: renovacio888@yandex.ru

Ключевые слова: рубец матки, мезенхимальные стромальные клетки, коллаген.

На сегодня наблюдается высокая распространенность кесарева сечения (КС) при оперативном родоразрешении, что связано со многими факторами, в т.ч. с увеличением числа первородящих пациенток позднего

репродуктивного возраста. При этом формирование неполноценного рубца на матке после КС является актуальной проблемой современной гинекологии, которая приводит к угрозе разрыва матки во время последующей беременности, повышению вероятности невынашивания беременности, нарушению прикрепления плаценты к стенке матки, плацентарной недостаточности. В связи с этим актуальна разработка подходов к восстановлению тканей матки с формированием полноценного рубца после оперативного родоразрешения в т.ч. с использованием клеточной терапии.

Цель данного исследования — изучить иммуногистохимические характеристики тканей матки кроликов при восстановлении после моделирования послеоперационного рубца матки на фоне введения клеточного продукта на основе мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Предмет исследования — экспрессия коллагена (Coll) I и III типа, вносящих значительный вклад в механическую прочность ткани матки, и их соотношение по содержанию: в интактной мышечной ткани матки оно приближено к 1:1. МСК выделяли из биоптатов жировой ткани ферментативным способом по стандартной методике и культивировали в стерильных условиях при 37 °С, 5% CO₂, 100% влажности в ростовой среде (α -MEM, 10% фетальной бычьей сыворотки, 2mM глутамина, 1% смеси антибиотиков-антимикотиков). В эксперименте использовали жизнеспособные культивированные клетки (95–98%) 3 пассажа, имеющие фенотип CD29+/CD44+/CD90+/CD105+/CD34-/CD45-. Моделирование рубцового процесса: под действием наркоза контрольным и опытным животным в области матки, острым путём на расстоянии 1 см от места сращения маточных рогов производили два разреза через все слои размерами 1 см на правом и левом рогах матки. Раны ушивали непрерывным швом. В сформированные разрезы в матке кроликов опытной группы после ее ушивания в область потенциального формирования рубца вводили МСК. По истечении срока наблюдения (7-е, 14-е сутки и спустя 30 суток после оперативного вмешательства) животные контрольной и опытной группы выводились из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики в соответствии со стандартами GLP и производился забор их маток. Образцы ткани фиксировали и по стандартной методике подготавливали для иммуногистохимического окрашивания с использованием первичных антител к Coll I, III и коммерческой системы визуализации антител «2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System» (Elabscience). Количественную оценку экспрессии Coll I, III выполняли путем анализа цифровых изображений с использованием алгоритма «positive pixel count» программы для морфометрии «Aperio Image Scope 12.1.0.5» и расчёта индекс экспрессии исследуемых маркеров. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0. В результате исследования выявлено, что при травматическом повреждении тканей матки в эксперименте развивается нарушение их морфологии, развивается дезорганизация, дискомплексация слоев. При этом восстановительный процесс в тканях матки животных, которым вводили МСК в место формирования потенциального рубца, был более полноценным, по сравнению с таковым в случае без введения клеток, соотношение Coll I и III было близко к 1:1. Можно сделать вывод, что применение МСК у животных в эксперименте по формированию модели рубцовых процессов позволяет оптимизировать регенерацию тканей матки, ускорить сроки и повысить эффективность ее восстановления.

РАЗРАБОТКА БИОТКАНИ НА ОСНОВЕ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БИОГЕЛЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ СИНДРОМА АШЕРМАНА

**Р.А. Полтавцева, А.Ю. Пульвер,
Н.А. Пульвер, Е.В. Свирицевская**

ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии
и перинатологии им. академика В.И. Кулакова
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия

e-mail: rimpol@mail.ru

Ключевые слова: биогель, биоткань, синдром Ашермана, противоспаечный эффект.

Основной причиной вторичного бесплодия является механическая травма базального слоя эндометрия после родов или аборта, что в ряде случаев приводит к формированию не рассасывающихся спаек — синехий. В данной работе разработан биоматериал (Биоткань, БТ) на основе термочувствительного биополимера поли-N-изопропилакриламида (ПНИПААм), конъюгированного с биологическими добавками для терапии вторичного бесплодия.

В состав БТ входят белки тромбоцитарного лизата (ТЛ) плазмы крови и экстракт внеклеточного матрикса (ВКМ), выделенный из ткани эндометрия в соотношении ПНИПААм, ВКМ, ТЛ как 10:3.5:1.5. В качестве контроля использовали гель на основе коллагена. Исходный гель ПНИПААм не токсичен, что показано в экспериментах *in vitro* с использованием панели клеточных линий и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из эндометрия человека. Очищенный ТЛ обладал стимулирующим эффектом (на 15–20%) в культурах *in vitro*, после конъюгации с ПНИПААм эффект снижался, но был достоверным (5–12%). Очищенный компонент ВКМ оказывал стимулирующее влияние на МСК, полученные из эндометрия, но не влиял на пролиферацию клеточных линий. При конъюгации эффект ВКМ на МСК сохранялся (5–10%). Полученная БТ стимулировала пролиферацию, метаболическую активность клеток и повышала адгезию к белкам внеклеточного матрикса МСК. Полученная БТ сохраняла способность к застудневанию при 32 °С. Таким образом, в экспериментах *in vitro* показали, что БТ, сохраняла свойства термочувствительности и биоактивности.

Для анализа противоспаечного эффекта *in vivo* нами была разработана экспериментальная модель повреждения глубоких слоёв эндометрия на маточных рогах крысы, что приводило к формированию синехий. Введение БТ в полости оперированных рогов приводило к частичному восстановлению эндометрия. Далее проводили анализ наступления беременности, для этого через 3 недели после операции самок подсаживали к самцам. Анализ наступления беременности отслеживали по весу оперированных самок. Финальные результаты оценивались по количеству родившихся крысят, с последующим патологоанатомическим и гистологическим анализом маточных рогов. Показали количество крысят у оперированных крыс, хотя их количество было меньше нормы ($2,3 \pm 1,5$ против $4,2 \pm 2,1$ на каждый маточный рог соответственно).

Таким образом, проведенные исследования позволили разработать биоткань на основе ПНИПААм, конъюгированного с биологически активными субстанциями, обладающую противоспаечной активностью, позволяющей как частично восстановить эндометрий матки, так и обеспечить имплантацию яйцеклеток. Работа выполнена по государственному заданию Министерства Здравоохранения Российской Федерации на 2020–2022 годы (№ АААА-А20-120022790039-1).

ПОЛУЧЕНИЕ 3D МОДЕЛИ КОЖИ ПУТЕМ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ И КЕРАТИНОЦИТОВ

А.Ю. Полянская¹, Е.Р. Павлова^{1,2},
М.В. Волкова¹, В.В. Бояринцев¹,
А.В. Трофименко¹, Г.И. Фильков¹, Д.В. Багров^{2,3},
Д.В. Клинов^{1,2}, М.О. Дурыманов¹

¹ НИУ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

² НИИ физико-химической медицины ФМБА ул. Малая Пироговская, Москва, Россия

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

e-mail: polyanskaya.ayu@phystech.edu

Ключевые слова: 3D модель кожи, фибробласты, кератиноциты, дифференцировка клеток, эпидермис.

Разработка 3D моделей кожи и исследование их свойств является актуальной задачей, поскольку на данный момент во многих странах запрещено тестирование косметических средств на животных, а также импорт и продажа косметики, содержащей ингредиенты, протестированные на животных [1, 2]. Эквиваленты кожи, полученные путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов могут быть использованы для этих целей, также для тестирования лекарственных препаратов, изучения механизмов биологических процессов в коже [3].

Целью данной работы является получение 3D модели кожи путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов, а также изучение дифференцировки кератиноцитов методом иммуногистохимии криосрезов.

Для получения 3D модели использовали первичные фибробласты и кератиноциты, которые были выделены из кожи новорожденных мышей возрастом 1 день. Результаты по идентификации клеток путем иммуногистохимии и проточной цитометрии показали, что чистота популяций составила более 90%.

Результаты иммуногистохимии образцов 3D моделей, которые были получены на 5 и 10 день культивирования на границе среда/воздух свидетельствуют о наличии в эквивалентах кожи маркеров, характерных для фибробластов (виментин), базальных кератиноцитов (цитокератин 5), кератиноцитов на начальных стадиях дифференцировки (цитокератин 10), а также терминально дифференцированных клеток эпидермиса (лорикрин). Наличие рогового слоя установлено уже на 5й день культивирования, что говорит о том, что кератиноциты в составе полнослойного эквивалента кожи в течение этого срока уже достигают терминального уровня дифференцировки. Полученная 3D модель обладает анатомической организацией схожей с нативной кожей мыши. В образцах, которые культивировали 10 дней на границе среда/воздух, по сравнению с эквивалентами, полученными после 5 дней культивирования, наблюдали увеличение рогового слоя, а также увеличение числа кератиноцитов, экспрессирующих цитокератин 10.

Литература:

1. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R et al. Wounds 2019. V. 31. P. 308–315.
2. Vivcharenko V, Wojcik M, Przekora A. Cells. 2020. V. 9(5), P. 1185.
3. Niehues H, Bouwstra J.A, El Ghalbzouri A et al. Exp Dermatol. 2018. V. 27(5). P. 501–511.

ВЛИЯНИЕ LPA И Y-27632 НА СРЕДНЮЮ СКОРОСТЬ МИГРАЦИИ КЛЕТОК FETMSC, НАХОДЯЩИХСЯ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

А.В. Полянская, А.С. Мусорина,
Г.Г. Полянская, Д.Е. Бобков

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: polyanskaya.nastya18@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, актиновый цитоскелет, репликативное старение, малые ГТФазы Rho, клеточная подвижность.

Оценка подвижности мезенхимных стволовых клеток (МСК) в процессе длительного культивирования, сопровождающегося репликативным старением (РС), является важным шагом для их эффективного применения в регенеративной медицине. Малая ГТФаза RhoA регулирует организацию актинового цитоскелета, а следовательно, определяет характер подвижности немышечных клеток. Нижестоящим эффектором RhoA является ROCK1-киназа, которая способствует формированию стресс-фибрилл.

Целью работы было исследование роли RhoA в регуляции подвижности МСК человека, находящихся на разных стадиях РС. Было изучено влияние активатора RhoA — лизофосфатидной кислоты (LPA) и ингибитора ROCK1-киназы (Y-27632) на подвижность клеток в культуре.

Использовали клеточную линию FetMSC, выделенную из костного мозга эмбриона человека. Линия была получена из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН. Для измерения скорости клеток на пассажах 12, 16, 20 и 26 анализировали треки клеточных движений, записанные в течение 24 ч с помощью системы прижизненной конфокальной микроскопии. Результаты показали отсутствие достоверных отличий средней скорости контрольных клеток на изученных пассажах.

На 12 пассаже средняя скорость клеток под действием модуляторов были ниже и достоверно отличались от контроля ($23,1 \pm 5,1$ $\mu\text{m}/\text{ч}$), а также различались между собой — наименьшая скорость была у клеток, которые находились под действием Y-27632 ($12,04 \pm 2,6$ $\mu\text{m}/\text{ч}$). На 16 пассаже средняя скорость клеток во всех трех группах статистически не отличалась. На 20 пассаже достоверно снизилась только средняя скорость клеток под действием LPA. На 26 пассаже средняя скорость клеток, относительно контроля ($20,8 \pm 6,8$ $\mu\text{m}/\text{ч}$) достоверно снизилась: $17,1 \pm 6,8$ $\mu\text{m}/\text{ч}$ — под действием LPA, $18,15 \pm 5,2$ $\mu\text{m}/\text{ч}$ — под действием Y-27632.

Результаты демонстрируют, что репликативное старение FetMSC сопровождается изменением чувствительности клеток к действию LPA и Y-27632.

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ, ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И ГЕНОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В КЛЕТКАХ КОЛОНОСФЕР ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ОПУХОЛЕВЫМИ И СТВОЛОВЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева,
А.А. Ризванов, В.В. Соловьева

НИЛ «OpenLab Генные и клеточные технологии», Казань, Россия

e-mail: i.ponomarev2013@gmail.com

Ключевые слова: колоносферы, мембранные везикулы, опухолевые клетки, мезенхимные стромальные клетки.

Внеклеточные везикулы представляют собой мембранные структуры, играющие важную роль в межклеточных коммуникациях, поскольку они обладают способностью транспортировать липиды, факторы транскрипции, мРНК и белки. Имеются данные об особой роли везикул в прогрессировании рака. Поэтому изучение влияния везикул на опухолевые сфероиды имеет важное значение. Целью данной работы является изучение влияния мембранных везикул, индуцированных цитохалазином В (иМВ), на сфероиды колоректального рака *in vitro*.

В этом исследовании для создания опухолевых сфероидов использовали клеточную линию колоректального рака (HCT-15). Клеточная линия глиобластомы (SNB-19) и мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани (МСК), были использованы для выделения МВ. Везикулы из SNB-19 (SNB-19 иМВ) и МСК (МСК иМВ) выделяли с использованием 10 мкг/мл цитохалазина В и серии последовательных центрифугирований. Добавление SNB-19 иМВ и иМВ МСК к сфероидам осуществляли в концентрациях 1, 2 и 5 мкг. Влияние SNB-19 иМВ и иМВ МСК анализировали с использованием проточной цитометрии, мультиплексного анализа и ПЦР в реальном времени.

После добавления МСК иМВ не было значительного изменения жизнеспособности клеток в сфероиде. Однако при добавлении иМВ SNB-19 в колоносферу наблюдалось дозозависимое повышение жизнеспособности клеток. Уровни мРНК OCT4 и Nanog повышались после добавления SNB-19 иМВ, но снижались после добавления иМВ МСК. Цитокиновый анализ показал значительные различия в 40 основных цитокинах в колоносферах с SNB-19 иМВ и МСК иМВ.

Таким образом, показано возможное влияние SNB-19 иМВ и МСК иМВ на опухолевые сфероиды. Необходимы дальнейшие исследования эффектов этого механизма. Данное исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 21-74-10021. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

ТКАНЕВОЙ ЭКВИВАЛЕНТ ЭНДОКРИННОГО ОТДЕЛА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, А.О. Никольская, З.З. Гоникова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов

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

e-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Ключевые слова: тканевой эквивалент поджелудочной железы, островки Лангерганса, тканеспецифический биоматрикс, децеллюляризация.

Одним из направлений технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины для лечения сахарного диабета 1 типа является создание тканевого эквивалента эндокринного отдела поджелудочной железы (ПЖ) на основе тканеспецифического биоматрикса (ДПЖ матрикса) из децеллюляризованной панкреатической ткани [1]. Сохранение в ДПЖ матриксе структурных, биохимических и биомеханических свойств нативного ВКМ при максимально полном удалении клеточного материала позволяет имитировать микроокружение, способствующее пролонгированной функции жизнеспособных островковых клеток *in vitro* и *in vivo* [2].

Цель работы: исследовать влияние ДПЖ матрикса на инсулинпродуцирующую функцию жизнеспособных островков Лангерганса (ОЛ) крысы и человека.

Материалы и методы. ДПЖ матрикс получали в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ крысы (Vistar) и человека с применением поверхностно-активных веществ при различных режимах обработки панкреатической ткани. ОЛ крысы и человека выделяли, используя традиционную модифицированную методику с использованием коллагеназы, и культивировали в монокультуре (контрольные группы Ккр и Кч) и в присутствии ДПЖ матрикса (опытные группы Окр и Оч). Жизнеспособность ОЛ определяли методом флуоресцентного окрашивания витальным красителем, секреторную способность — методом иммуноферментного анализа (ИФА). Изменения концентраций инсулина в опытных группах оценивали относительно контрольных групп.

Результаты исследования. ОЛ, культивированные с ДПЖ матриксами, не проявляли признаков фрагментации и дегенерации, оставаясь жизнеспособными в течение всего срока наблюдения (7 суток) по сравнению с монокультурой ОЛ. Базальная концентрация инсулина в опытных группах Окр повышалась по сравнению с контрольной группой Ккр на 48,7%, 102,9% и 373,6% на первые, третьи и шестые сутки культивирования, соответственно. Базальная концентрация инсулина в опытных группах Оч на первые сутки культивирования возрастала на 39,5% по сравнению с контрольной группой Кч, а на четвертые и седьмые — на 55,3% и 68,1%, соответственно. Предварительные результаты экспериментов *in vivo*, полученные на малой выборке лабораторных животных, подтвердили функциональную эффективность тканевого эквивалента ПЖ на основе ДПЖ матрикса и ОЛ крысы при внутрибрюшинном введении.

Заключение. Выявлено позитивное влияние аллогенных тканеспецифических биоматрикса на жизнеспособность ОЛ. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана принципиальная возможность создания тканевого эквивалента эндокринного отдела ПЖ.

Литература:

1. Damodaran R.G., Vermette P. et. al. J Tissue Eng Regen Med. 2018. V. 12 (5). Pp 1230–1237.
2. Sevastianov V.I., Baranova N.V., Kirsanova L.A. et. al. J Gene Engg Bio Res. 2021. V. 3 (2). Pp 17–25.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ МЕЗОТЕЛИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НА ДЕСЕРОЗИРОВАННУЮ СТЕНКУ ЖЕЛУДКА КРЫСЫ

Ю.В. Пономарева¹, Н.Н. Сарбаева¹, В.И. Белоконов², М.Н. Милякова¹, М.В. Королев³

¹ ООО «АРТБИО», Самара, Россия

² ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

³ ЧУОО Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

e-mail: artbio_com@mail.ru

Ключевые слова: децеллюляризация, ацеллюлярный дермальный матрикс, мезотелий, спаечная болезнь брюшной полости.

Для снижения числа осложнений (спаечной болезни, свищей, инкапсуляции), связанных с имплантацией

синтетических эндопротезов интраперитонеально и перитонеально, предложены композитные материалы, изолирующие покрытия и антиадгезивные препараты [1]. Эффект их применения краткосрочен. Ацеллюлярные матрицы, получаемые из тканей животных и человека, являются не только пластическим материалом, но и могут служить поверхностью для восстановления целостности брюшины, тем самым снижая число таких осложнений.

Цель — изучить структурные изменения, клеточную реакцию и формирование мезотелия на поверхности ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ), имплантированного на десерозированную переднюю стенку желудка крысы.

АДМ получен при липодермэктомии у пациентов с вентральными грыжами по разработанной технологии [2]. Образцы АДМ 0,5×0,5 см имплантированы крысам стока Wistar обоего пола (n=21) под общей анестезией интраперитонеально на предварительно десерозированную переднюю стенку тела желудка с фиксацией серозно-мышечными швами по периметру на 28, 45 и 90 суток. Структура АДМ и клеточная реакция исследована на гистологических срезах. Формирование мезотелия — по экспрессии НВМЕ-1.

К 28 суткам АДМ сращен с передней стенкой желудка. Структура коллагеновых волокон АДМ сохранена. Материал диффузно инфильтрирован лимфоцитами, макрофагами, тучными клетками, фибробластами. Межфибрилярные пространства неравномерно заполнены рыхлой неоформленной соединительной тканью. На периферии многочисленные тонкостенные капилляры с эритроцитами в просвете.

К 45 и 90 суткам АДМ плотно сращен с подлежащими тканями, собственная структура сохранена. Межфибрилярное пространство равномерно заполнено соединительной тканью. Преобладающая популяция клеток — фибробласты. Между мышечным слоем передней стенки желудка и поверхностью АДМ — прослойка гипervasкуляризованной соединительной ткани. На поверхности АДМ, обращенной к брюшине только к 90 суткам, было идентифицировано формирование слоя мезотелиальных клеток, определяемых по выраженной цитоплазматической и мембранной экспрессии ими НВМЕ — 1.

Таким образом, АДМ может быть рассмотрен как перспективный имплантируемый материал, сочетающий в себе пластические, барьерные (на ранних сроках) и регенеративные свойства.

Литература:

1. Baylón R., Rodríguez-Camarillo P., Elías-Zúñiga A. et. al. *Membr.* 2017. V. 7. № 3. P. 47.
2. Сарбаева Н.Н., Милякова М.Н., Пономарева Ю.В. Способ получения дермального матрикса. Пат. РФ № 2694543, кл. А61L 27/38. 2019.

РЕАКТИВНЫЙ АСТРОГЛИОЗ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ И ТЕРАПИИ СИНАПТАМИДОМ

А.И. Пономаренко, И.В. Манжуло

ФГБУН Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия

e-mail: arina.ponomarenko.93@mail.ru

Ключевые слова: N-докозагексаэноилэтанолламин; синаптамид; легкая черепно-мозговая травма; лЧМТ; астроглия; BDNF; биомаркеры; СОД; nNOS.

По данным клинических исследований лЧМТ составляют 80–90% всех травм головы и представляют серьезную проблему современного здравоохранения в связи с развитием значительных отдаленных последствий, развивающихся в основном из-за дезадаптации глияльной реакции. Астроциты, чувствительные к изменениям во внеклеточной среде, служат критическими ранними ответчиками на повреждение головного мозга [1]. В связи с этим фармакологическое воздействие на астроглию представляется наиболее перспективной терапевтической стратегией лечения последствий лЧМТ. На сегодняшний день имеется огромное количество доклинических данных, свидетельствующих о наличии положительного терапевтического эффекта препаратов, содержащих ω-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) и их производные, при остром поражении головного мозга [2].

N-докозагексаэноилэтанолламин (синаптамид) является высокоактивным метаболитом докозагексаэновой кислоты (ДГК) с нейропротекторными, синаптогенными, нейритогенными и противовоспалительными свойствами в нервной системе [3]. Результаты данного исследования демонстрируют влияние синаптамида на астроглиальный ответ на повреждение в острой (1 сутки) и хронической (7 суток) фазах развития лЧМТ. ВЭЖХ-МС исследование выявило увеличение концентрации синаптамида в коре головного мозга и сыворотке крови экспериментальных животных в несколько раз при подкожном введении (10 мг/кг/сут). С помощью иммуногистохимии показано, что синаптамид регулирует активацию GFAP- и S100β-положительной астроглии, снижает pNOS-положительное иммуоокрашивание и стимулирует секрецию нейротрофина BDNF. Динамика продукции супероксиддисмутазы при обработке синаптамидом подтверждает антиоксидантную эффективность тестируемого соединения. С помощью вестерн-блоттинга мы обнаружили снижение биомаркеров ЧМТ, таких как GFAP, S100β и IL-6, в сыворотке крови экспериментальных животных, получавших синаптамид. Полученные результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале синаптамида в снижении тяжести последствий поражения головного мозга. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант 13.1902.21.0012, договор № 075-15-2020-796).

Литература:

1. Burda, J.E.; Bernstein, A.M.; Sofroniew, M.V. *Exp. Neurol.* 2016. V. 275. P. 305–315.
2. Wu, A.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. J. *Neurotrauma.* 2011. V. 28. P. 2113–2122.
3. Devane, W.A.; Axelrod, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 6698–6701.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТОК МЫШИ В ЛИНЕЙНОМ ГРАДИЕНТЕ ФИКОЛЛА

Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.А. Степанов, К.А. Артемьева, Н.Б. Тихонова

НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

Ключевые слова: сперматогонии, сперматиды, сперматоциты, мейоз, разделение клеток.

Разделение сперматогенных клеток необходимо для изучения разных стадий их дифференцировки [1, 2]. Пул однородных клеток на одной стадии развития характеризуются определенной морфологией. Существует корреляция между типом клеток и их размерами, диаметром ядра, удельным весом. Эти особенности позволяют разделять клетки по группам в градиенте плотности с использованием системы STA-PUT, в которой происходит седиментация клеток под действием силы тяжести [2, 3].

Материалы и методы. У самцов мышей линии C57Bl/6 проводили забор семенников в среду DMEM при 4°C. Семенные каналцы разрезали на фрагменты и помещали в раствор коллагеназы IV типа в концентрации 0,16 мг/мл на 20 мин при 37°C. Далее проводили обработку р-ром фермента проназы E (0,5 мг/мл). На конечном этапе клетки центрифугировали при 320g 10 мин при 4°C и помещали в полную питательную среду DMEM, 10% FCS и 20 мкг/л гентамицина. Разделение проводили в системе STA-PUT, состоящей из камер для создания градиента: 1 — для 3% р-ра фикола, 2 — для 1% р-ра фикола, камеры для седиментации клеток, перистальтического насоса. Фракции собирали со скоростью 10 мл/мин. по 10 мл в пробирки, затем центрифугировали при 1900 g и 4°C 10 мин., осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Делали мазки суспензии, фиксировали их в жидкости Шабдаша, окрашивали Шифф-реактивом и гематоксилином Майера. С помощью светового микроскопа Leica DM2500 определяли морфологию клеток с разделением по группам и подсчетом на 1000 клеток. Анализ данных проводили в программе Sigmastat 3.5.

Результаты и обсуждение. Впервые с помощью цитологических и морфометрических методов нами был определен состав клеточных фракций и выделены наиболее показательные пики групп клеток. Так, сперматогонии наблюдали в 43–50 фракциях линейного градиента фикола (48–77,3%), клетки профазы I мейоза обнаруживали преимущественно в 28–32 фракциях (35,2–77,7%), а сперматиды — в 33–39 фракциях (27–78%). Описанный метод седиментации можно успешно применять для предварительного разделения клеток с целью дальнейшего исследования их цитофизиологических и молекулярных особенностей.

Литература:

1. Глазков М.В. Онтогенез. 1980. Т. 11. № 5. С. 555–8.
2. Romrell L.J., Bellvé A.R., Fawcett D.W. Dev Biol. 1976. V. 49. № 1. P. 119–31.
3. Liu Y., Niu M., Yao C. et al. Sci Rep 2015 V. 5. P. 8084.

ПЕРСПЕКТИВЫ БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ОРГАНО-НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ОКСИДА ЦЕРИЯ В СФЕРЕ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

**А.Л. Попов¹, И.В. Савинцева¹,
Н.Н. Чукавин¹, В.К. Иванов²**

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

² Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва, Россия

e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Ключевые слова: органические полимеры, наночастицы, оксид церия (CeO₂), регенерация.

Органические полимерные материалы довольно широко используются в биомедицинских целях. Композиции для кожного применения и тканевой инженерии обычно содержат природные биологические полимеры — альгинат, желатин, коллаген и др. Благодаря своей биосовместимости, малой токсичности и способности усиливать регенеративные процессы — эти биополимеры представляют особый интерес для медицины. Несмотря на стремительное расширение применения полимеров в медицине, следует признать, что в этой области остается ряд острых нерешенных вопросов. Так, например, при использовании полимерных компонентов с целью замены органов и тканей организма нередки случаи отказа от этих изделий. До сих пор актуальна проблема бактериального обсеменения имплантируемых изделий, что приводит к образованию бактериальных и грибковых биопленок, быстрому разрушению поверхности материала и воспалению тканей. С другой стороны, существует проблема избыточной стабильности полимерных изделий в организме (например, шовных нитей или носителей лекарств) и медленной биодеградации. Некоторые недостатки таких полимеров можно решить, используя органо-неорганические композиты, модифицированные биоактивными наноматериалами.

Наночастицы солей и оксидов редкоземельных элементов, в первую очередь церия, являются весьма перспективным неорганическим компонентом в этих композиционных системах. Наночастицы оксида церия (CeO₂) в качестве наполнителя полимеров, адаптированных для биомедицины, позволяют решить ряд вопросов. Нестабилизированные или стабилизированные наночастицы CeO₂ являются хорошо известным терапевтическим агентом в регенеративной медицине и тканевой инженерии [1]; они стимулируют пролиферацию фибробластов *in vitro* и ускоряют заживление поражений *in vivo*, открывая перспективы для терапии ран. Материалы на основе биополимеров широко используются в клеточных технологиях для получения биосовместимых матриц, обладающих хорошей адгезией к стволовым мезенхимальным клеткам, эффективно пролиферирующих и дифференцирующихся на них, в частности, они перспективны для культивирования фибробластов человека; введение в них наночастиц CeO₂ в качестве неорганического компонента значительно повышает степень пролиферации клеток, что ранее нами было показано [2]. Нами также было показано, что наночастицы CeO₂ являются уникальным неорганическим митогеном, способствуя регенерации целого организма — пресноводных плоских червей [3].

Таким образом использование биоактивных и биосовместимых функциональных наноматериалов может позволить решить ряд существующих проблем в области создания новых биомедицинских изделий для регенеративной медицины и клеточных технологий.

Работы выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-73-10231.

Литература:

1. Shcherbakov A.B. et al. Polymers 2021, 13(6), 924.
2. Popov A.L., et al. Materials Science and Engineering: C 68, 2016, 406–413.
3. Ermakov A.M., et al. Materials Science and Engineering: C 2019, 104, 109924.

ПОИСК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПТОМ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РЕЗКОМ СНИЖЕНИИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Д.В. Попов^{1,2}, П.А. Махновский¹, А.А. Борзых¹,
Е.М. Леднев¹, Т.Ф. Вепхвадзе^{1,2}, Н.С. Курочкина¹,
Е.С. Томиловская¹, О.И. Орлов¹

¹ Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: danil-popov@yandex.ru

Ключевые слова: скелетная мышца, гипокинезия, «сухая» иммерсия, транскриптом, транскрипционный фактор, РНК секвенирование, позиционная весовая матрица, открытый хроматин.

Резкое снижение двигательной активности (постельный режим, микрогравитация в космосе и т.п.) оказывает негативное влияние на функции скелетных мышц и на организм в целом. Так, уже через неделю гипокинезии происходит снижение мышечной массы (~0,4%/день) и силы, митохондриальной плотности, активности окислительных ферментов и работоспособности, а также инсулиновой чувствительности мышц и организма. Эти изменения связаны с подавлением трансляции, увеличением деградации мышечных белков и с масштабными изменениями в генной экспрессии. Изменение транскриптомного профиля скелетных мышц, вызванное гипокинезией, достаточно хорошо охарактеризовано [1, 2], однако регуляторные механизмы, ответственные за эти изменения (в частности, транскрипционные факторы и ассоциированные с ними сигнальные пути), изучены явно недостаточно.

В докладе обсуждается влияние резкого снижения двигательной активности (6 суток нахождения в «сухой» иммерсии) на изменения транскриптомного профиля (RNA-seq) *m. soleus* — основной постуральной мышцы, состоящей преимущественно из медленных мышечных волокон, и смешанной *m. vastus lateralis*. В базальном состоянии генная экспрессия значительно различается между этими мышцами (~1500 мРНК). Нахождение в иммерсии вызывает значительно более выраженные изменения транскриптома в *m. soleus* (562 мРНК увеличили и 996 мРНК снизили экспрессию), чем в *m. vastus lateralis* (209 мРНК увеличили и 392 мРНК снизили экспрессию).

Среди генов, изменивших экспрессию, были выделены кластеры со сходным экспрессионным профилем — предположительно, корегулируемые гены. Поиск транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением экспрессии, проводили для каждого кластера методом позиционных весовых матриц. Для этого искали мотивы связывания транскрипционных факторов в индивидуальном для каждого гена протоморном регионе — открытый хроматин вокруг старта инициации транскрипции, определённый в нашем предыдущем исследовании [3] по данным ATAC-seq, DNase-seq и ChIP-seq.

Предложенный нами подход позволил выявить группы коэкспрессируемых генов и несколько десятков транскрипционных факторов, ассоциированных с разнонаправленными изменениями генной экспрессии в них. Часть из этих транскрипционных факторов выделены как потенциальные мишени для предотвращения негативно влияющего гипокинезии на функции скелетных мышц. Значимость этих факторов для развития указанных

негативных эффектов требует дальнейшей проверки в модельных исследованиях с подавлением/увеличением генной экспрессии на клетках и/или животных. При поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г.

Литература:

1. Pillon N.J., Gabriel B.M., Dollet L. et al. Nat Commun. 2020. V. 11(1). P. 470.
2. Makhnovskii P.A., Bokov R.O., Kolpakov F.A., et al. Int J Mol Sci. 2021. V. 22(3). P. 1208.
3. Makhnovskii P.A., Gusev O.A., Bokov R.O., et al. Hum Genomics. 2022. V. 16(1). P. 24.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КАРДИОМИОБЛАСТОВ ПОЖИЛЫМ ПАЦИЕНТАМ С КАРДИОТОКСИЧЕСКИМИ ЭФФЕКТАМИ ХИМИОТЕРАПИИ

О.Е. Поповкина, Л.Ю. Гривцова

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

e-mail: popovkinaoe@mail.ru

Ключевые слова: кардиотоксичность, хроническая сердечная недостаточность (ХСН), перфузия миокарда, кардиомиобласты, трансплантация, сократительная функция миокарда.

Актуальность: кардиотоксичность противоопухолевой терапии у пожилых пациентов чаще всего проявляется в виде ХСН, встречается от 5 до 57% [1, 2]. Существующие методы лечения не приводят к восстановлению количества утраченных кардиомиоцитов и уменьшению фиброза в миокарде, что могло бы увеличить сократимость и уменьшить прогрессирование ХСН [3].

Цель: оценить влияние трансплантации кардиомиобластов на показатели сократимости и перфузии миокарда при проведении химиотерапии (ХТ) у пожилых пациентов.

Материалы и методы: 3 группы пациентов (22 мужчины, 38 женщин с сердечно-сосудистой патологией и онкологическими заболеваниями в возрасте от 65 до 80 лет): 1-я — клеточная терапия после возникновения кардиотоксических эффектов на фоне ХТ, 2-я — превентивное введение кардиомиобластов, 3-я — контроль (медикаментозная терапия). Распределение пациентов по классификации NYHA: ХСН I — 35%, ХСН II — 43,75%, ХСН III — 21,25%. Контроль структурно-функциональных показателей — ЭхоКГ и сцинтиграфия миокарда с Tc99m через 2, 6, 12 месяцев.

Результаты: по данным ЭхоКГ ФВ ЛЖ значимо ($p < 0,05$) увеличилась в группах 1 и 2. В 3-й группе ФВ снижалась. Данные коррелировали с динамикой встречаемости гипокинеза участков миокарда ЛЖ в группах. По данным сцинтиграфии выявлено усиление перфузии миокарда в ответ на трансплантацию кардиомиобластов у больных с клинически выраженной ХСН. При введении кардиомиобластов в 1-й группе перфузия миокарда усиливалась на длительный период, но в меньшей степени, чем в группе 2. Положительная динамика отмечена во все сроки контроля, максимальна — через 6 мес. В 3-й группе — начиная с 2-го месяца, отмечена отрицательная динамика на фоне постоянной кардиотропной терапии. Прогрессирования основного заболевания за 12 месяцев наблюдения не отмечено.

Выводы: применение трансплантации кардиомиобластов пожилым пациентам с онкологическими

заболеваниями, особенно превентивное введение, позволяет повысить эффективность лечения ХСН, развивающейся при кардиотоксичной ХТ.

Литература:

1. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России; 2015.
2. A.A. Matthews; Sh.P. Hinton; S. Stanway; et al. *Lund J Natl Compr Canc Netw* 2021; 19(3): 275–284.
3. Заплутанов В.А., Литовкин А.В., Белов В.Г. и др. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2016;5(2):25–28.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИМЕДИЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ И СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА

Т.Н. Попырина¹, Т.С. Демина^{1,2}, Т.А. Аكوпова¹

¹ Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: tanjapopyrina@yandex.ru

Ключевые слова: производные, сополимеры, хитозан, микрочастицы, макропористые гидрогели, нетканые волокнистые материалы.

Ввиду большого количества требований, предъявляемых к материалам биомедицинского назначения, необходимо регулировать их свойства, в том числе за счет расширения спектра доступных технологий формирования. Хитозан — продукт деацетилирования линейного полисахарида хитина, является ценным природным полимером и обладает способностью к биодegradации и биосовместимостью. Однако, существуют технологические ограничения при формировании материалов на его основе. Модифицирование его химической структуры позволит использовать различные подходы к получению трехмерных материалов с регулируемой структурой и свойствам.

Цель работы заключалась в разработке технологических подходов к получению материалов биомедицинского назначения в форме микрочастиц, нетканых микроволоконистых материалов и макропористых гидрогелей на основе производных и сополимеров хитозана.

Ряд производных и сополимеров хитозана с олиголактидами получен с использованием механохимических методов в отсутствие катализаторов и инициаторов процессов. Макропористые гидрогели на их основе были получены методом лиофильной сушки с последующей термообработкой [1]. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии, все образцы гидрогелей обладали макропористой структурой с разветвленной системой взаимосвязанных пор широкого диапазона размеров, а также имели высокие степени влагопоглощения, зависящие от химической структуры сополимера.

Микрочастицы из полилактида, покрытые хитозаном или его производными и сополимерами, были получены методом испарения растворителя из эмульсии «масло/вода» [2]. Применение в качестве эмульгатора в дисперсионной среде производных и сополимеров хитозана позволило увеличить выход микрочастиц и изменить их распределение по размерам. Микрочастицы обладали сферической формой и однородной морфологией

поверхности. Качественный анализ химической структуры поверхности микрочастиц, проведенный с использованием селективного по отношению к аминогруппам хитозана флуоресцентного красителя, подтвердил наличие гидрофильных фрагментов полисахарида. Это позволило использовать полученные микрочастицы в качестве исходного материала для формирования трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания [3].

Методом электроформования из сополимеров хитозана с олиго/полиэфирными были сформованы нетканые микроволоконистые материалы с широким распределением волокон по размерам и с выраженной шероховатостью поверхности. Качественный анализ химической структуры поверхности материала подтвердил наличие на ней гидрофильных фрагментов [4].

Литература:

1. Popyrina T.N. et. al. *Polym. Sci. Ser. B*. 2021. V. 63. № 5. P. 536–543.
2. Demina T. et. al. *Polymers*. 2021. V. 13. № 18. P. 3045.
3. Demina T.S. et. al. *J. Mater. Res.* 2022. V. 37. № 4. P. 933–942.
4. Demina T.S. et. al. *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 64. P. 37652–37659.

ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК C2C12

М.О. Порошина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия

e-mail: mia.poroshina@yandex.ru

Ключевые слова: миогенез, сукцинат, клеточная линия C2C12.

Сукцинат (анион янтарной кислоты) локализован в матриксе митохондрий, является важнейшим метаболитом цитратного цикла, а также вносит существенный вклад в образование аденозинтрифосфата (АТФ). Изучен путь сукцината как лигананда: при передаче сигнала через сукцинатные рецепторы (SUCNR1) происходит индукция мобилизации Ca^{2+} , активация протеинкиназы C, фосфорилирование внеклеточных регулируемых киназ (ERK1/2), что может способствовать синтезу и дифференцировке структурных белков миотрубок [1]. Поэтому настоящее исследование посвящено изучению влияния сукцината на дифференцировку клеток C2C12.

Исследование выполнено на клеточной линии мышечных миобластов C2C12, предоставленной Институтом биологии гена (Москва). Экспериментальные группы: клетки до дифференцировки — инкубация 7 дней в питательной среде с 10%-эмбриональной бычьей сывороткой; индукция дифференцировки миобластов — инкубация 7 дней в питательной среде с 2%-лошадиной сывороткой [2]; индукция дифференцировки миобластов с добавлением сукцината (Acros Organics, США) — клетки инкубировали 7 дней в дифференцировочной питательной среде с сукцинатом в концентрации 10мкМ. Методом вестерн-блот определяли содержание миозина и α -актина. Анализ результатов производили с помощью программы «StatSoft Statistica 13.0». Для оценки статистической значимости различий использовали

дисперсионный анализ, post-hoc по критерию Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Клеточная линия C2C12 (мышинные миосаттелициты) является классическим примером миобластов, демонстрирующих миогенез мышечной ткани. На питательной среде с 10%-бычьей сывороткой происходит пролиферация клеток, при замене на среду с 2%-лошадиной сывороткой, в уже образовавшемся монослое запускается процесс дифференцировки. Добавление сукцината усиливало процесс дифференцировки миобластов клеточной линии C2C12 — клетки сливались в митотубы. Уровень миозина на 7 день эксперимента, при использовании дифференцировочной среды и среды с сукцинатом увеличивался относительно показателей клеток до дифференцировки на 35,6% ($p=0,004$) и 60% ($p=0,005$) соответственно. При использовании сукцината отмечалось увеличение содержания α -актина на 50% ($p=0,04$) по сравнению с клетками до дифференцировки и на 25% ($p=0,05$) по сравнению с клетками на 7 день дифференцировки.

В ходе данного исследования было установлено, что сукцинат в концентрации 10 мкМ способствует дифференцировке клеток C2C12.

Литература:

1. Mills E., O'Neill L.A.J. Trends in Cell Biology. J. 2014. V. 24. P. 328.
2. Yaffe D., Saxel O. Nature. 1977. N. 270. P. 727.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

**М.П. Потапнев¹, С.И. Кривенко², В.Г. Богдан³,
Ф.Н. Карпенко¹, А.Б. Михновская¹, В.И. Асаевич¹**

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь

² Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь

³ Национальная академия наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

e-mail: mpotapnev@yandex.by

Ключевые слова: препараты растворимых факторов тромбоцитов, медицинское применение.

Препараты растворимых факторов тромбоцитов (РФТ) человека за последние двадцать лет вызывают все возрастающий интерес для медицинского применения с целью регенерации поврежденных тканей человека [1, 2]. Получаемые из крови пациентов или здоровых лиц, жидкие или гелеобразные препараты РФТ начали широко использовать как для клеточной терапии (на этапах наращивания мезенхимальных стромальных клеток или их локального введения), так и самостоятельно [3]. Нами отработаны технологии получения и стандартизации этих препаратов как изделий медицинского назначения (ИМН) из концентрата тромбоцитов, полученного из периферической крови пациентов или здоровых лиц — доноров крови [4]. Основное требование к крови — отсутствие признаков воспаления (лейкоцитоз, нейтрофилез), трансфузионно-трансмиссивных инфекций, концентрация тромбоцитов для приготовления ИМН — $1,0-1,5 \times 10^{12}/л$, микробиологическая безопасность.

Приготовленные в РНПЦ трансфузиологии и мед. биотехнологий ИМН на основе РФТ хранятся в замороженном состоянии при температуре минус 30–35°C без потери биологической активности (в тесте пролиферации МСК человека in vitro) в течение 2 лет.

Наш опыт местного клинического применение препаратов РФТ показал их эффективность при (особенно инфантированных) язвах кожи, заболеваниях опорно-двигательного аппарата, хронической ишемии нижних конечностей, кератоконъюнктивите. Возможно инъекционное или аппликационное (в том числе вместе с тромбином) введение ИМН пациентам. Наблюдаемое клиническое улучшение у большинства пациентов не зависело от длительности заболевания и проявлялось эффектом обезболивания, ускоренного ангиогенеза, снижения местного воспалительного процесса, повышения работоспособности и качества жизни. В части случаев наблюдали полный возврат к исходному состоянию здоровья больных. Мы не наблюдали осложнений применения препаратов РФТ, хотя в нескольких случаях были краткосрочные реакции на введение, проходившие без врачебного вмешательства. У большей части больных использовали аутологичные препараты РФТ, при наличии противопоказаний и ограничений (возраст более 65 лет, сахарный диабет, тяжесть заболевания) применяли аллогенный препарат РФТ, получаемый от здоровых доноров крови.

Сделано заключение о широкой перспективе использования препаратов РФТ в медицинской практике.

Литература:

1. Andia I., Abate M. Regen. Med. 2013; 8(5): 645–658.
2. Потапнев М.П., Арабей А.А., Кондратенко Г.Г. и др. Здоровоохранение, 2014; 9: 32–40.
3. April G., Gandini G., Guaschino R. et al. Blood Transfusion. 2013; 11(4): 611–622.
4. Потапнев М.П., Кривенко С.И., Богдан В.Г. и др. Здоровоохранение, 2018; 10: 38–44.

СИСТЕМНОЕ VS ЛОКАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

**М.П. Потапнев¹, С.М. Космачева¹, Л.А. Репина¹,
А.Г. Ионова¹, Н.В. Гончарова¹, Ю.Н. Рушкевич²,
С.А. Лихачев², Т.В. Докукина³, Ф.П. Хлебоказов³**

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь

² Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Республика Беларусь

e-mail: mpotapnev@yandex.by

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки человека, внутривенное и эндолюмбальное введение, боковой амиотрофический склероз, симптоматическая эпилепсия.

Актуален поиск путей повышения эффективности применения клеточных продуктов на основе мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека. Системное (внутривенное, внутриартериальное) введение МСК является широко распространенным (43%) методом

клеточной терапии [1]. Его преимущества — системное влияние на пациента, опосредованное иммуномодулирующим, противовоспалительным и антиапоптотическим действием. Недостатки — необходимость высокой терапевтической дозы МСК (1–2 млн/кг веса), риски неблагоприятных реакций и осложнений (лихорадка, микротромбозы, короткий срок жизни, быстрая утилизация) [2, 3]. Локальное (внутрисуставное, внутрисердечное, интратрахеальное, в область поражения) или региональное (внутримышечное, внутривенное, эндолумбальное) введение МСК позволяют снизить (в 5–10 раз) терапевтическую дозу клеток и оказать адресное воздействие на поврежденную ткань. Локально вводимые МСК проявляют регенеративную активность, мобилизуя прогениторные клетки в очаг поражения [2, 4]. Усиление эффективности и пролонгирование локального воздействия может быть достигнуто праймированием МСК при культивировании *in vitro* и/или введении вместе с биодеградируемым гелем [2].

Наш опыт проведения клеточной терапии пациентам с нейродегенеративными заболеваниями базировался на использовании как системного/внутривенного, так и локального/эндолумбального введения МСК. Один курс клеточной терапии пациентов с боковым амиотрофическим склерозом или симптоматической эпилепсией предполагал оба пути введения МСК. Такая тактика позволила обеспечить клинический ответ у 80% (в контроле — 5–15%) пациентов в течение 12 месяцев наблюдения.

Сделано заключение о целесообразности комбинированного подхода к использованию МСК для лечения нейродегенеративных заболеваний человека.

Литература:

1. Kabat M., Bobkov I., Kumar S. et al. Stem cells Transl. Med. 2020; 9:17–27.
2. Levy O., Kuai R., Siren E.M.J. et al. Sci. Adv. 2020;6: eaba6884
3. Zhuang W.Z., Lin Y.H., Wu M.S. et al. J. Biomed. Sci. 2021; 28:28
4. Caplan H., Olson S.D., Kumar A. et al. Front Immunol. 2019; 10:1645.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ САПЛИМЕНТОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

В.Р. Потапова¹, И.В. Гилевич^{1,2}, Е.А. Коломийцева²

¹ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

² ГБУЗ НИИ Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского МЗ КК, Краснодар, Россия

Ключевые слова: фибробласты, лизат тромбоцитов, саплимент, условия культивирования.

Выбор условий культивирования имеет важное значение при разработке биомедицинского клеточного продукта. Используемые при культивировании добавки должны быть безопасны, эффективны и доступны для технологического процесса. Фетальная бычья сыворотка (ФБС), широко используемая при культивировании, как саплимент для продукта клинического назначения, не подходит, так как является ксеногенным материалом. Целью нашей работы стало определение оптимального

саплимента, который будет обеспечивать жизнеспособность и повышать пролиферативную активность клеток.

В эксперименте сравнивали влияние разных условий культивирования на морфофункциональные свойства трёх клеточных линий дермальных фибробластов, 4 пассажа. Фибробласты культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, США) и 100 ед/мл антибиотика-антимикотика. В качестве саплиментов использовали: 1) 10% ФБС — контрольная группа (КГ); 2) 10% плазму человека АВ группы, полученную на станции переливания крови — опытная группа (ОГ № 1); 3) 5% обогащенную тромбоцитами плазму (ОбТП) — ОГ № 2; 4) 5% лизат тромбоцитов (ЛТ) — ОГ № 3. ОбТП выделяли из периферической крови путём двойного центрифугирования и хранили при –20°C. ЛТ готовили из ОбТП, подвергшейся циклу глубокой заморозки при –80°C и разморозке при +37°C, с последующим хранением при –20°C.

Анализ пролиферативной активности клеток при разных условиях показал, что время удвоения популяции клеток в ОГ № 1 было длиннее и составило в среднем 70,17 часов, в ОГ № 2 и ОГ № 3 наблюдалось сокращение времени удвоения — 58,67 ч. и 47,67 ч., соответственно, по сравнению с КГ (59,17 ч.). При одинаковой плотности засеивания наибольшее количество клеток было получено в ОГ № 2 и № 3 по сравнению с КГ и ОГ № 1, что дополнительно подтвердило факт повышения пролиферативной активности клеток с саплиментами на основе продуктов из тромбоцитов. Время достижения конfluence в КГ составило 7 суток, в ОГ № 1 — 9 суток, в ОГ № 2 — 8 суток, и наименьшим время было в ОГ № 3 — 6 суток. Результаты ХТТ-теста показали, что ни один из саплиментов не оказывал цитотоксического действия на фибробласты, но при этом наблюдалось значительное увеличение жизнеспособности клеток в ОГ № 2 и № 3 по сравнению с ОГ № 1 и КГ. Цитохимический тест Live and Dead визуально подтвердил сохранение жизнеспособности клеток при разных условиях. Все клетки вне зависимости от условий экспрессировали виментин, отсутствовала экспрессия *α-sma*.

Таким образом, культивирование с 5% ЛТ (ОГ № 3) более эффективно по сравнению с другими, так как использование данного саплимента в качестве добавки к питательной среде даёт возможность в наиболее короткие сроки достичь конfluence, а также позволяет получить высокую пролиферативную активность и сохраняет жизнеспособность клеток. Культивирование фибробластов таким способом может быть рекомендовано для разработки биомедицинского клеточного продукта.

ВЛИЯНИЕ ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА И СУБХОНДРАЛЬНОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Е.В. Пресняков^{1,2}, Н.И. Жемков¹, П.С. Подлужный¹, В.В. Церцей¹, Е.С. Рочев², И.Я. Бозо², Р.В. Деев^{1,2}

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия,

² ООО «Гистографт», Москва, Инновационный центр «Сколково», Россия,

e-mail: uvpres@gmail.com

Ключевые слова: ген-активированные остеопластические материалы, октакальциевый фосфат, гидрогелевые материалы для регенерации, репаративный остеогенез, репаративный хондрогенез.

Гонартрит является самым распространенным заболеванием опорно-двигательного аппарата, поражая порядка 30% людей старше 45 лет во всем мире [1]. В настоящее время лечение остеоартрита сводится к симптоматической терапии в ранний период, и хирургическому вмешательству на поздних стадиях болезни. Микрофрактурирование, мозаичная пластика и ауто-трансплантация хрящевой ткани становятся сегодня все более доступными хирургическими методами лечения, направленными на сохранение сустава. Однако, в ряде случаев, подобные методы сопряжены с развитием рецидивов и ухудшением состояния пациента. В этой связи, продолжается поиск новых подходов к лечению остеоартрита, одним из которых может стать применение ген-активированных материалов.

Целью исследования являлась оценка влияния разработанного ген-активированного материала на регенерацию суставного хряща и субхондральной кости в эксперименте *in vivo*.

Исследуемый материал состоял из гранул на основе октакальциевого фосфата (ОКФ) с плазмидной ДНК, несущей ген фактора роста эндотелия сосудов (pl-VEGF) («Гистографт», Россия) и геля на основе гиалуроновой кислоты («Ostenil», Германия), в котором размещалась дополнительная фракция pl-VEGF. Контрольные образцы были представлены гранулами ОКФ и гиалуроновым гелем без генной активации. В ходе исследования 9 кроликам породы советская шиншилла формировали дефекты суставных поверхностей мыщелков бедренных костей ($d = 3$ мм, $h = 4$ мм) с последующей имплантацией исследуемых изделий. Результаты оценивали на сроках 30, 60, 90 сут. после проведения операции с помощью гистологического исследования, а также гистоморфометрии.

Через 30 сут. после операции в обеих группах области как хрящевого, так и субхондрального дефектов были заполнены остатками гелевого компонента и гранулами ОКФ, окруженными плотной волокнистой соединительной тканью. Статистически значимые различия по составу регенерата выявлены не были.

Через 60 сут. в обеих группах в области суставного дефекта следы геля не визуализировались, регенерат был представлен фиброзной хрящевой тканью. В области субхондрального дефекта гранулы ОКФ были окружены тонкой сетью трабекул ретикулофиброзной костной ткани с ярко выраженным ангиогенезом в экспериментальной группе.

К 90-м сут. структура хрящевого регенерата в экспериментальной группе была наиболее близка к исходному строению гиалинового хряща. Субхондральная область в обеих группах была представлена мультитканевым регенератом, с преобладающим количеством вновь образованных кровеносных сосудов ($p < 0,05$) в опытной группе.

Таким образом, ген-активированный материал на основе гиалуроновой кислоты, гранул ОКФ и pl-VEGF оказался эффективен для реконструкции суставных дефектов в эксперименте.

Литература:

1. Katz, J. N., Arant, K. R., & Loeser, R. F. (2021). Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*, 325(6), 568–578.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ SVF И PRP В ЛЕЧЕНИИ МЕДИАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТА КОЛЕННОГО СУСТАВА В КОМБИНАЦИИ С ВЫСОКОЙ ТИБИАЛЬНОЙ ОСТЕОТОМИЕЙ

А.П. Призов¹, И.И. Еремин², А.А. Никитин¹, Н.В. Загородний¹, Ф.Л. Лазко¹, Е.А. Беляк¹, М.Ф. Лазко¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² Государственный научный центр Российской Федерации ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б. В. Петровского», Москва, Россия

e-mail: aprizov@yandex.ru

Ключевые слова: медиальный гонартрит, стромально-вазкулярная фракция, обогащенная тромбоцитами плазма, варусная деформация.

Современная концепция лечения медиального гонартрита предполагает дополнение остеотомии внутрисуставными инъекциями биологически активных веществ, таких как обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) или стромально-вазкулярная фракция (SVF). В данном исследовании оцениваются результаты введения вышеперечисленных биологически активных веществ, относительно клинических и артроскопических отдаленных результатов.

В исследование вошли 20 пациентов с медиальным остеоартритом (ОА) коленного сустава (КС) и варусной деформацией. Пациенты разделены на 2 группы по 10 человек, которым выполнялась артроскопия коленного сустава и высокая тибиальная остеотомия (ВТО) с последующим внутрисуставным введением SVF в первой группе, и PRP во второй. Через 1,5 года производилась артроскопия коленного сустава, оценивалась регенерация хряща. Критерии включения: пациенты от 18 до 65 лет с индексом массы тела (ИМТ) менее 40 кг/м², объемом движений в КС $\geq 90^\circ$, сгибательной контрактурой $\leq 10^\circ$, степенью остеоартроза медиального компартмента от II до III ст. по Kellgren-Lawrence, интактным наружным компартментом КС и пателло-фemorальным сочленением, варусной деформацией $\geq 4^\circ$ и $\leq 14^\circ$. Для функциональной оценки коленного сустава использовались шкалы KOOS, KSS и VASL.

После операции пациенты были отслежены до 1,5 лет. Ось нижней конечности изменилась в 1 группе в среднем с $6,1^\circ$ варуса до $1,7^\circ$ вальгуса, во 2 группе с $8,2^\circ$ варуса до $1,9^\circ$ вальгуса. Средний результат по шкале KOOS в 1 группе улучшился с 40,1 баллов до 69,6 баллов, во 2 группе улучшился с 41,0 баллов до 80,1 баллов. Средний результат по шкале VASL в 1 группе улучшился с 73,0 мм до 25,0 мм., во 2 группе улучшился с 66,0 мм до 9,0 мм. Средний результат по шкале KSS1 в 1 группе улучшился с 44,8 баллов до 70,9 баллов, во 2 группе улучшился с 53,5 баллов до 79,8 баллов. Средний результат по шкале KSS 2 в 1 группе улучшился с 49,1 баллов до 80,5 баллов, во 2 группе улучшился с 51,5 баллов до 91,0 балла. Регенерация хряща на бедре в 1 группе наблюдалась в 80%, на большеберцовой кости в 70%. Регенерация хряща на бедре во 2 группе наблюдалась в 40%, на большеберцовой кости в 60%.

При анализе клинических результатов групп через 1,5 года по методу Манна-Уитни, отмечается наличие статистической значимости различий между показателями

в группах по шкалам KOOS и VASQ ($p > 0,05$), и её отсутствие при анализе KSS ($p > 0,05$). В 1 группе клинические результаты значимо хуже по шкалам KOOS и VASQ за счёт большего количества интраоперационных переломов в зоне остеотомии и меньшей величины вальгусной коррекции. Однако, количество переломов и величина вальгусной коррекции не имеют статистически значимой разницы ($p > 0,05$). При введении SVF регенерация хрящевой ткани наблюдается статистически значительно чаще, чем с PRP ($p > 0,05$), что может увеличивать сроки выживаемости результатов ВТО.

АДАПТАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ТРАНС-СПЛАЙСИНГА ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ

**А.Л. Примак^{1,2}, Н.А. Басалова^{1,2},
М.Н. Скрыбина¹, А.Е. Толстолужинская^{1,2},
А.Ю. Ефименко^{1,2}, М.Н. Карагяур^{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

e-mail: primak.msu@mail.ru

Ключевые слова: клеточные модели, транс-сплайсинг, пре-транс-РНК.

Экспериментальные клеточные модели являются удобным инструментом для установления функции отдельных молекул, механизмов работы сигнальных и метаболических каскадов, а также для выяснения патогенеза широкого спектра заболеваний и идентификации новых терапевтических мишеней. Генетические технологии (редактирование генома, «генная терапия» *ex vivo* и транс-сплайсинг) позволяют моделировать все более тонкие изменения в структуре генома и белков, и создавать модельные объекты, максимально приближенные к первичным клеткам.

Транс-сплайсинг представляет собой природный механизм сплайсинга нескольких пре-мРНК в единую зрелую мРНК. Данный механизм впервые был открыт у простейших рода *Trypanosoma*, которые с помощью данного механизма регулируют экспрессию собственных генов. К преимуществам данного подхода относятся небольшой размер генетической конструкции, кодирующей ПТР, высокая эффективность его доставки, а также высокая степень согласованности/конкордантности образования специфического продукта транс-сплайсинга с экспрессией целевого гена, что позволяет имитировать результат редактирования гена в его природном контексте при значительно большей эффективности. Технология транс-сплайсинга позволяет моделировать любые модификации кодирующей части целевых генов от точечных замен и замен отдельных экзонов до масштабных вставок и мечения целевых белков. В то же время, транс-сплайсинг по своей эффективности уступает цис-сплайсингу и нередко приводит к образованию сплайс форм мРНК, нехарактерных для физиологического сплайсинга, а, следовательно, к образованию новых не физиологичных форм белков.

Согласно данным литературы, оптимизация дизайна пре-транс-РНК (ПТР), дополнение его siRNA/shRNA к цис-формам РНК и новыми snRNA, направляющими процессы сплайсинга, позволяют значительно увеличить эффективность и специфичность механизма транс-сплайсинга. В данной работе нами была изучена возможность применения транс-сплайсинга для создания генетически

модифицированной линии клеток нейробластомы Neuro2a, экспрессирующей изоформу рецептора урокиназного активатора плазминогена uPAR, неспособную взаимодействовать с белком внеклеточного матрикса витронектином. Мы предполагаем, что полученная клеточная модель может быть использована для изучения механизмов функционирования и внутриклеточной сигнализации Plaur в процессах нейритогенеза, навигации и роста нервного волокна. Для улучшения эффективности транс-сплайсинга нами была проведена оптимизация пре-транс-РНК.

Изучение механизмов транс-сплайсинга и его оптимизация может повысить эффективность создания клеточных моделей на основе трудно модифицируемых типов клеток, а также ключом к разработке новейших эффективных методов терапии/коррекции наследственных заболеваний, в том числе в рамках зрелого организма.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00125.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ С ПОМОЩЬЮ НАПРАВЛЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК С МУТАЦИЕЙ P.ASN515DEL В ГЕНЕ MYBPC3 В КАРДИОМИОЦИТЫ IN VITRO

**К.А. Проняева¹, Л.Ш. Шаяхметова^{1,2},
Е.В. Дементьева¹, С.В. Павлова¹**

¹ ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, Новосибирск,
Россия

e-mail: ks_pronyaeva@mail.ru

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, клиническое значение мутаций, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, кардиомиоцит.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является распространённой сердечно-сосудистой патологией, приводящей к прогрессирующей сердечной недостаточности, аритмиям, а также увеличивающей риск внезапной сердечной смерти. ГКМП характеризуется структурными изменениями миокарда, которые приводят к диастолическим дисфункциям. Более 1000 различных мутаций в генах, в основном кодирующих саркомерные белки, могут быть ответственны за развитие наследственной формы данного заболевания. Однако не для всех выявленных мутаций доказана их способность вызывать ГКМП, а так же лишь для ограниченного их числа понятен механизм действия. Изучение взаимосвязи между мутациями в саркомерных белках и нарушением структуры кардиомиоцитов, а также их электрической стабильности ограничено сложностью получения образцов сердечной ткани.

Целью данного исследования ставилось создание клеточной модели гипертрофической кардиомиопатии с помощью направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с делецией p.Asn515del в гене MYBPC3 в кардиомиоциты.

Ранее в лаборатории были получены ИПСК пациента HCM14 (ICGi029-A, Европейский реестр стволовых клеток человека). Так же были получены изогенные линии с мутацией p.Asn515del в гене MYBPC3 в геноме условно здорового пациента K7(ICGi022-A). ИПСК трех линий пациента HCM14, трех линий с внесёнными мутациями K7-515del, линии изогенного контроля K7 и условно здоровых пациентов K6 (ICGi021-A) и K9 были запущены

в кардиальную дифференцировку. После окончания протокола дифференцировки кардиомиоциты были рассажены в редкой плотности, на 34–36 день клетки фиксировались и окрашивались антителами к маркерам кардиомиоцитов. Площадь клеток определяли в результате анализа изображений с помощью пакета ImageJ. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью пакета программ R.

В результате данной работы путём направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты была получена линия клеток с мутацией p.Asn515del в гене MYBPC3 с достоверным увеличением площади кардиомиоцитов. Данная линия в дальнейшем может быть использована как тканевая модель гипертрофической кардиомиопатии *in vitro*. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00271.

СИСТЕМА ЛАЗЕРНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЛОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ

Т.Е. Пылаев^{1,2}, Е.С. Авдеева^{1,2}, Н.Г. Хлебцов^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение ФИЦ СНЦ РАН, Саратов, Россия

³ ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

e-mail: pylaev.te@staff.sgmu.ru

Ключевые слова: трансфекция, клеточные культуры, золотые нанозвезды, оптопорация, генотерапия, внутриклеточная доставка.

Разработка надежных технологий для получения биомедицинских клеточных продуктов с репрограммированным геномом является одной из приоритетных задач современной биоинженерии. Активно идут разработки новых и исследования существующих систем доставки [1] на основе различных носителей и/или с применением физического воздействия [2]. Тем не менее, до сих пор не существует технологии, одновременно безопасной и совместимой с различными клеточными типами и доставляемыми агентами. Отдельно следует упомянуть о невозможности масштабирования и автоматизирования некоторых существующих систем, что крайне важно на этапах продвижения в реальную практическую плоскость, в том числе для задач регенеративной медицины.

Мы предлагаем новую технологию плазмон-индуцированной оптопорации клеток для эффективной и безопасной доставки целевых генов, совместимую с различными типами клеток [3]. Принцип работы системы состоит в кратковременном увеличении проницаемости мембран клеток, выращенных на монослоях золотых наночастиц (ЗНЧ), за счет кратковременного локального нагрева частиц, индуцируемого лазерным облучением резонансной длины волны. Монослои ЗНЧ получены непосредственно на культуральном пластике (планшетах либо чашках Петри), что является прекрасным биосовместимым субстратом для адгезионных клеток [4]. Главным преимуществом системы является возможность тонкой настройки под индивидуальные особенности клеток и доставляемых агентов путем регулировки режимов облучения и параметров монослоев ЗНЧ. Мы протестировали возможности системы для целого ряда контрастных по свойствам

клеток млекопитающих (HeLa, A431, CHO, RAW 264.7) и доставляемых агентов широкого размерного диапазона: от молекулярных красителей (пропидий иодид, 700 Да), контрольных плазмид (3–10 т.п.н.) до меченых декстранов с массой от 10 до 100 кДа. Возможность настройки режимов облучения на используемой импульсной 1064-нм наносекундной лазерной установке с узкофокусированным пучком позволила получить обнадеживающие результаты для всех протестированных линий в сравнении с коммерческими агентами для липофекции.

Таким образом, предлагаемая система является крайне перспективным вариантом трансфекции клеток *in vitro*, и может быть адаптирована для сложных объектов, таких как первичные и стволовые клетки. Кроме того, возможность масштабирования открывает перспективы для практического внедрения нашей технологии плазмонной оптопорации для решения задач персонализированной медицины и клеточной биоинженерии.

Литература:

1. Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Chem. Rev. 2018. V. 118. P. 7409.
2. Pylaev T.E., Avdeeva E.S., Khlebtsov N.G. J. Innov. Opt. Health Sci. 2021. V. 14. Art. 2130003.
3. Pylaev T., Vanzha E., Avdeeva E. et al. J. Biophoton. 2019. V. 12. Art. e201800166.
4. Pylaev T.E., Efremov Yu.M., Avdeeva E.S. et al. ACS Appl. Nano Mater. 2021 V. 4. P. 13206.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО БИЦИСТРОННОГО ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ С ГЕНАМИ VEGF165 И HGF ЧЕЛОВЕКА

А.В. Раднаева², П.И. Макаревич², М.А. Болдырева¹, Е.В. Парфёнова^{1,2}

¹ Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ Кардиологии Минздрава России им. Е.И. Чазова, Москва, Россия

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

e-mail: arina.radnaeva05@gmail.com

Ключевые слова: генная терапия, критическая ишемия нижней конечности, бицистронный плазмидный вектор, ангиогенез, миогенез, нейрогенез, VEGF, HGF

В последние годы для лечения критической ишемии нижней конечности (КИНК) наиболее перспективным направлением является терапевтический ангиогенез с применением методов генной терапии. Среди векторных систем преимуществом с точки зрения безопасности обладают плазмиды. Представленная в данном исследовании бицистронная плаزمиды рHGF/VEGF позволяла одновременно доставлять гены двух ангиогенных факторов роста (АФР), комбинация которых на данный момент является одной из самых эффективных [1]. Благодаря наличию в составе плазмиды двух независимых экспрессионных кассет при эффективности трансфекции в 71,96%±0,3% достигается практически эквивалентная концентрация целевых белков — 1:1,62 (HGF/VEGF165), что благоприятно для активации ангиогенеза.

Предыдущие исследования плазмиды рHGF/VEGF доказали ее высокую эффективность относительно уменьшения распространения площади некроза

в ишемизированной скелетной мышце и активации ангиогенеза [2]. В изучении возможного миогенного эффекта выяснилось, что rHGF/VEGF не обладает выраженным влиянием на образование и рост новых миофибрилл в ишемизированной скелетной мышце. С другой стороны, данный факт свидетельствует о безопасности плазмидного вектора относительно митогенной активности.

Также в данной работе было впервые исследовано влияние экспрессируемых факторов (VEGF165 и HGF) на аксональный рост в средах после трансфекции HEK293T плазмидой rHGF/VEGF. Было установлено, что выраженный рост и ветвление аксонов не наблюдается при воздействии АФР по сравнению со всеми отрицательными контролями, однако, с другой стороны, и не подавляется.

Для клинической картины КИНК характерно наличие воспалительных процессов. По результатам исследования, один из контролей которого — препарат сравнения «Неоваскулген» (ПАО «Институт стволовых клеток человека», Россия), rHGF/VEGF способствует уменьшению воспаления путем снижения инфильтрации макрофагов в ишемизированной мышце. Особенно выражен этот эффект в сравнении с «пустым» вектором (pVAX2), для которого характерно развитие иммунного ответа. Фенотипирование макрофагов позволило детально проанализировать инфильтрацию ишемизированной мышцы: оценивалась как вся популяция CD68⁺, так и только M2⁺ субпопуляция. В результате генной терапии с использованием rHGF/VEGF количество M2⁺ макрофагов в поврежденной ткани значительно возросло по сравнению со всеми контрольными группами, а также препаратом сравнения «Неоваскулген», что свидетельствует в пользу противовоспалительного действия исследуемого вектора.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00181 «Выяснение механизма участия факторов роста эндотелия (VEGF) и гепатоцитов (HGF) при регенерации ишемизированных скелетных мышц».

Литература:

1. Makarevich P.I. et al. PLOS ONE. 2018. Vol. 13 № 5. P. 1–25.
2. Slobodkina E. et al. Pharmaceuticals. 2020. Vol. 12. № 12. P. 1–23.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МСК КРЫС И ЧЕЛОВЕКА И ИХ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ПРИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ НА МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А. Расторгуева, Т.А. Астрелина, В.А. Брунчуков, Ю.Б. Сучкова, И.В. Кобзева, Д.Ю. Усупжанова, Е.Е. Ломоносова, В.А. Никитина, В.А. Брумберг, А.М. Комлев, А.С. Самойлов

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

e-mail: rastorgueva.ann@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, местные лучевые поражения, кондиционированная среда, клеточные технологии, рентгеновское излучение.

Местные лучевые поражения (МЛП) могут возникать не только в чрезвычайных ситуациях, но и в рядовых случаях, например у человека, проходящего лучевую терапию. Использование клеточной терапии для лечения МЛП базируется на восстановлении погибших клеток базального слоя эпидермиса, куда входят в том числе пролиферирующие клетки кожи [1–3].

Цель: изучение процессов регенерации при лечении МЛП кожи МСК и их кондиционированной средой на лабораторных животных.

Материалы и методы: в исследование включено 120 белых крыс-самцов линии Wistar рандомизированных на 6 групп: контроль (К), животные не получали терапию; контроль с введением концентрата культуральной среды (КС) трехкратно на 1,14,21 сутки; введение МСК слизистой десны человека (ДЧ) в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1,14,21 сутки; введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека (ДЧКС) в расчетной дозе трехкратно; введение МСК слизистой десны крысы (ДК) в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно; введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы (ДККС) в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно. Проводились гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Культивировали МСК по стандартной методике до 3–5 пассажа, осуществляли забор кондиционированной среды и концентрировали ее в 10 раз.

Результаты: на 112-е сутки отмечалось полное заживление язвы кожи у 40 % животных в группе КС, у 60 % в группе ДЧ, у 20 % животных в группах ДЧКС, ДККС, в группах К и ДК не было ни одного животного с затянувшейся раневым дефектом.

Заключение: таким образом, все использованные методы лечения были эффективны при МЛП и приводили к уменьшению площади поражения, сокращению времени заживления язвы, улучшению регенеративных процессов. Положительная экспрессия маркера VEGF отмечалась в группах К и КС на 28-е сутки и в опытных группах (ДЧ, ДЧКС, ДК, ДККС) на 112-е сутки. Статистически значимое увеличение маркера CD68 отмечено в группах К, ДК и ДККС, а в остальных группах отмечено уменьшение количества макрофагов.

Литература:

1. Брунчуков В.А., Астрелина Т.А., Никитина В.А. и др. Гены и клетки. 2019, т.14 Приложение с. 41
2. Zheng K, Wu W, Yang S, Huang L, Chen J et al. 2015. Mol Med Rep 12(5): 7065–7071.
3. Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А. и др. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021. Т. 66. № 4. С.5–12.

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «НЕОВАСКУЛГЕН» ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Т.С. Расулов¹, П.С. Тимашев², П.И. Котенева², Н.В. Кошелева², А.Л. Файзуллин², Т.В. Брайловская^{1,2}, А.П. Ведяева^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦ ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава России, Москва, Россия

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

e-mail: rasulov.doc@gmail.com

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, «Неоваскулген», дентальная имплантация

Дефицит костных и мягких тканей десны снижает эффективность дентальной имплантации особенно в эстетически

значимых зонах. Распространённое в клинической практике применение коллагенсодержащих мембран не всегда позволяет восстановить нужный объем десны. Цель работы — разработка новой тканеинженерной конструкции (ТИК) для повышения эффективности восстановления объема мягких тканей десны при дентальной имплантации.

Экстракты коллагенсодержащих мембран Mucoderm (Botiss Biomaterials, Германия) и децеллюляризованного перикарда быка не обладали цитотоксическим действием, не снижали метаболическую (AlamarBlue assay) и пролиферативную (PicoGreen assay) активность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) десны человека. Дополнительным подтверждением сохранения метаболической активности МСК в присутствии исследуемых образцов послужили результаты теста на высвобождение лактатдегидрогеназы. К обоим образцам МСК десны человека успешно адгезировались и формировали монослой живых клеток за 3 и 7 суток на поверхности Mucoderm и Перикарда, соответственно (LiveDead assay). Генно-терапевтический препарат «Неоваскулген» (ФГБУ ГНЦ МЗ РФ), форма плазмиды, кодирующей эндотелиальный фактор роста сосудов, в максимальной концентрации 1,2 мг/мл снижал метаболическую активность МСК десны человека на 60% и снижал уровень пролиферации клеток в два раза относительно контроля в ростовой среде без добавок.

Эффективность восстановления мягких тканей десны сравнивали после проведения аугментации слизистой десны закрытым способом с имплантацией материалов под лоскут кроликам породы Серый великан (n=9), разделенным на 4 группы по имплантированным образцам: 1) перикард, заселенный МСК 2) Mucoderm, заселенный МСК 3) перикард, 4) Mucoderm. Биodeградацию и тканевую реакцию оценивали методом морфометрического анализа. К 10 суткам оба варианта ТИК на основе коллагеновых мембран прошли частичную краевую резорбцию без выраженных признаков тканевой реакции на имплантат, соединительнотканная капсула состояла из незрелой грануляционной ткани с единичными очагами нейтрофилов.

Таким образом, использование коллагеновых материалов в сочетании с МСК и(или) стимулирующим васкуляризацию генно-терапевтическим препаратом может стать альтернативой аутопересадки мягких тканей для увеличения толщины десны, что актуально в современной стоматологии при дентальной имплантации. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00401).

ВЛИЯНИЕ GDF11 НА MORFOFUNKЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ

А.Ю. Ратушный, Д.К. Матвеева, М.И. Ездакова

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

e-mail: ratushkin@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки (МСК), ASC52telo, GDF11, клеточное старение.

В настоящее время GDF11 активно исследуют в связи с его потенциальными геропротекторными свойствами и возможным применением в терапевтических целях. В нашей модели было изучено его влияние на «молодые» и сенесцентные мезенхимальные стромальные клетки человека, морфофункциональное состояние которых значительно различается.

Эксперименты проводили на иммортализованной стандартной линии МСК — ASC52telo (ATCC® SCRC-4000™). Клетки были предоставлены на некоммерческой основе из клеточного депозитария МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках проекта «Ноев ковчег». Клеточное старение индуцировали при помощи митомицина С (ММС).

При индукции клеточного старения отмечены характерные морфофункциональные изменения уже через 3 дня. Через 7 и 10 дней увеличение размера становилось более выраженным. Аутофлуоресценция увеличивалась в 7, в 12 и в 15 раз, соответственно, что указывает на накопление липофусцина. Активность лизосомального компартмента также увеличивалась в 4–6 раз. Активность митохондриального компартмента повышалась не более чем в 1,5 раза. Генерация АФК была увеличена в 1,5–5 раз.

В экспериментах было 4 группы МСК — «молодые» (ММС-/GDF11-) и сенесцентные (ММС+/GDF11-) клетки без добавления GDF11, а также «молодые» (ММС-/GDF11+) и сенесцентные (ММС+/GDF11+) клетки с добавлением GDF11 (10 нг/мл). Анализ проводили через 10 дней.

Оценивали распределение по фазам клеточного цикла (SubG1 тест) и клоногенную активность. Показано, что воздействие ММС полностью останавливает пролиферативную активность. GDF11+ культуры не отличались по количеству колоний от GDF11- образцов. SubG1 тест также не выявил выраженного влияния GDF11 на распределение «молодых» клеток (ММС-) по фазам клеточного цикла.

Жизнеспособность ММС+ клеток была снижена приблизительно на 10% вне зависимости от добавления GDF11. Оценка морфологических показателей FSC-A и SSC-A выявила увеличение данных показателей при обработке ММС. Добавление GDF11 приводило к небольшому снижению FSC-A и SSC-A как ММС-, так и ММС+ клеток. Также через 10 дней экспозиции анализировали активность внутриклеточных компартментов, уровень окислительного стресса и аутофлуоресценцию клеток. Обработка ММС приводила к повышению всех исследованных параметров. Влияние GDF11 было слабо выраженным. Тем не менее, отмечен ряд эффектов, обратных эффектам ММС, касающийся, в первую очередь, аутофлуоресценции, активности лизосомального компартмента и окислительных процессов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-75-10117.

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ОТДАЛЕННЫХ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ С ПОМОЩЬЮ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОСОМ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**М.Г. Ратушняк, А.С. Жирник, А.А. Парфёнова,
Ю.П. Семочкина, О.Д. Смирнова**

НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: ratushnyak_marya@mail.ru

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, экзосомы, гамма-излучение, головной мозг, облучение головы, когнитивные функции, мыши

Перспективным направлением регенеративной медицины является использование экзосом — мембранных везикул, секретируемых различными клетками и содержащих целый комплекс биологически активных веществ. Терапевтическая эффективность экзосом мезенхимальных стволовых клеток показана на моделях различных заболеваний и при ряде патологий. В то же время данные

о биологической активности экзосом нейральных стволовых клеток (НСК) весьма ограничены.

Целью работы было изучение возможности использования экзосом НСК мышцы для предотвращения когнитивных нарушений у мышей через 1 месяц после гамма-облучения головы в дозе 8 Гр.

Экзосомы были получены из кондиционированной среды НСК мышцы методом дифференциального ультрацентрифугирования и охарактеризованы по размеру, концентрации белка и наличию специфических экзосомальных маркеров (CD9, CD63, TSG101). Экзосомы в дозе 5 мкг по белку вводили интраназально мышам C57Bl/6 в течение 4 недель с интервалом 1–2 суток, начиная со вторых суток после гамма-облучения головы в дозе 8 Гр (установка «ГУТ-200М», источник — кобальт-60). Через 1 месяц после облучения оценивали поведение (тест «открытое поле») и эпизодическую память (тест «распознавание нового объекта») контрольных и облученных животных и облученных животных, получавших препараты экзосом НСК.

Использованные препараты везикул НСК имели средний размер частиц 40–70 нм, 99,5% из них имели маркеры CD9⁺CD63⁺TSG101⁺, что соответствует экзосомам. При анализе поведения в тесте «открытое поле» у мышей через 1 месяц после гамма-облучения головы в дозе 8 Гр обнаружено снижение общего пройденного пути, средней скорости и количества стоек, уменьшение длительности пребывания в промежуточной и центральной зонах арены и увеличение длительности пребывания в пристеночной зоне в сравнении с контролем. В то же время значения исследуемых параметров поведения облученных мышей, которым вводили экзосомы НСК, были на уровне необлученного контроля. При проведении теста «распознавание нового объекта» у облученных животных выявлено снижение эпизодической памяти, выраженное в схожем времени обследования нового и известного объектов через 24 часа после обучения. Напротив, контрольные и облученные мыши, которым вводили экзосомы НСК, проводили статистически значимо больше времени, исследуя новый объект: индекс распознавания составил 0,36±0,06 и 0,34±0,10 соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования экзосом НСК для предотвращения отдаленных пострадиационных нарушений поведения и когнитивных функций при интраназальном введении. Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ от 28.10.21 г. № 2757).

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ АКТИВИРОВАННОЙ МИКРОГЛИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ ЭКЗОСОМ

М.Г. Ратушняк, Д.А. Шапошникова, О.В. Высоцкая, Ю.П. Семочкина

НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: ratushnyak_marya@mail.ru

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, экзосомы, микроглия, цитокины, экспрессия генов.

В основе появления когнитивных нарушений при нейродегенеративных заболеваниях, черепно-мозговых травмах, а также в отдаленный период после облучения опухолей головного мозга при лучевой терапии лежит развитие нейровоспаления, обусловленного активацией микроглии (МГ). МГ характеризуется высокой пластичностью, выполняет защитную функцию, обеспечивая формирование

иммунного ответа, и регулирует функции нейронов, участвуя в удалении старых и образовании новых синапсов. При активации МГ секретирует провоспалительные цитокины и активные метаболиты кислорода и азота, что активизирует астроциты и может приводить к повреждению нейронов. Возможным способом стимуляции процессов регенерации и уменьшения нейровоспаления может быть использование нейральных стволовых клеток (НСК) и экзосом НСК. Показано, что препараты НСК человека и их экзосом обладали терапевтическим действием при экспериментальном инсульте и облучении мозга мышей благодаря регуляции активности МГ. Целью настоящей работы стало исследование возможности снижения уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в клетках активированной ЛПС МГ линии SIM-A9 при действии НСК и их экзосом. Для анализа влияния НСК и их экзосом на активированные клетки МГ их (1×10^6 клеток) активировали ЛПС (5 нг/мл) в течение 4 часов, отмывали от ЛПС и культивировали совместно с НСК (1×10^6 клеток). Препараты экзосом НСК получали из кондиционированной среды НСК методом дифференциального ультрацентрифугирования и характеризовали по размеру, концентрации белка и наличию специфических маркеров — CD9 и CD63. Для анализа влияния экзосом на уровень экспрессии генов в активированных ЛПС клетках МГ к ним добавляли экзосомы НСК в концентрации 0,5–15 мкг/мл по белку и культивировали в течение 24 ч, затем клетки замораживали при -80°C для последующего ПЦР-анализа экспрессии генов цитокинов.

При культивировании клеток SIM-A9 с ЛПС обнаружено увеличение экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Со-культивирование НСК с контрольным клеткам МГ не влияло на уровень экспрессии генов TNF α , IL-1 β и IL-6, а с активированными — приводило к снижению их экспрессии в 1,5 (IL-6) — 2 (TNF α и IL-1 β) раза, хотя она оставалась значимо увеличенной по сравнению с контрольными клетками МГ. Добавление экзосом НСК в концентрации 5, 10 и 15 мкг/мл по белку не влияло на экспрессию TNF α в активированных ЛПС клетках микроглии, а экспрессия IL-1 β снижается не значительно. Полученные результаты свидетельствуют о способности НСК регулировать активность клеток активированной МГ, обеспечивая противовоспалительное действие. При этом действие НСК на активированные клетки МГ не определяется прямым действием секретируемых ими экзосом, а связано с иными механизмами. Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ от 28.10.21 г. № 2757).

РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА СТИМУЛИРУЮТ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТКИ SH-SY5Y В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ИШЕМИЮ IN VITRO

И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Е.Я. Шевела

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

e-mail: iwwwanbets@mail.ru

Ключевые слова: макрофаги, нейрорегенерация, нейропротекция, ишемия, клетки SH-SY5Y.

Макрофаги человека (Мф) играют важную роль в регуляции процессов нейрорегенерации, одним из компонентов которой является пролиферация нейральных предшественников [1]. Известно, что Мф свойственна пластичность, т.е. способность изменять свой

функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения [2]. Однако влияние различно активированных Мф на нейрогенез практически не изучено.

Целью данной работы явилась сравнительная оценка влияния Мф с оппозитными фенотипами — классически активированных М1 (IFN- γ) и альтернативно активированных М2а (IL-4) — на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации ростовых/сывороточных факторов.

Материалы и методы. Мф генерировали из мононуклеарных клеток периферической крови доноров в присутствии 50 нг/мл GM-CSF и 10% FBS в течение 7 суток, добавляя 200 МЕ/мл IFN- γ и 20 нг/мл IL-4 на 5 сутки, соответственно для М1 и М2а. Кондиционную среду (КС) культур Мф использовали в концентрации 30% (V/v). Моделирование условий ишемии *in vitro* осуществляли посредством частичной депривации ростовых/сывороточных факторов (1% FBS). В качестве модели нейральных предшественников были использованы клетки линии нейробластомы человека SH-SY5Y, пролиферативную активность которых оценивали WST-тестом.

Результаты. Уже на 3 сутки культивирования в условиях депривации (1% FBS) пролиферативная активность клеток SH-SY5Y значительно снижалась в сравнении со стандартными условиями (10% FBS, позитивный контроль) ($p < 0,05$). В присутствии КС обоих исследуемых типов Мф уровень пролиферации повышался более, чем в 1,5 раза ($p < 0,05$) и превосходил не только депривационный, но и позитивный контроль, причём эффект КС М2а был значительно более выражен в сравнении с М1 ($p < 0,05$). На позднем сроке культивирования (7 сутки) в условиях депривации клетки также пролиферировали менее активно в сравнении со стандартными условиями ($p < 0,05$). Добавление КС Мф обоих типов приводило к восстановлению пролиферативной активности: в случае М1 — до уровня позитивного контроля, а в случае М2а — достоверно выше позитивного контроля ($p < 0,05$).

Таким образом, растворимые факторы Мф — как с М1, так и с М2а фенотипом — оказывают стимулирующий эффект на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих ишемию *in vitro*. Наиболее выражен данный эффект у Мф с М2 фенотипом, что позволяет рассматривать их как Мф с высоким нейрорегенераторным потенциалом.

Литература:

1. Xiong X., Liu L., Yang Q. Prog Neurobiol. 2016. V 142. P. 23–44.
2. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Annu Rev Pathol. 2020. V 15. P. 123–147.

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ ЦИКЛИЧЕСКОЙ РНК ГЕНА *SGMS1* ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С МАЛЫМИ РНК

Ю.А. Ремизова^{1,2}, О.Ю. Сударкина¹,
С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹,
И.Б. Филиппенков¹

¹ ФГБУ Институт молекулярной генетики, НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

e-mail: utoshkautoshka@gmail.com

Ключевые слова: циклические РНК, малые РНК, микроРНК, ген сфингомиелинсинтазы 1 (*SGMS1*) человека, сверхэкспрессия, ОТ-ПЦР в реальном времени, люциферазный репортер.

Циклические РНК (циклоРНК) представляют собой ковалентно замкнутые молекулы некодирующих РНК, характеризующиеся устойчивостью к действию экзонуклеаз. Их образование зачастую сопряжено с взаимодействием инвертированных повторов в РНК-предшественнике, что обеспечивает формирование кольцевой структуры при сплайсинге. Функциональная значимость циклоРНК в настоящее время активно изучается. Отдельным циклоРНК приписывают способность эффективно взаимодействовать с малыми РНК и нивелировать их активность [1].

Целью работы является изучение роли циклоРНК, образование которых было обнаружено нами ранее в числе транскриптов гена *SGMS1* человека [2, 3]. Кодированный данным геном фермент сфингомиелинсинтаза 1 принимает участие в регуляции внутриклеточного везикулярного транспорта, пролиферации клеток, апоптозе и других процессах, в том числе, связанных с регенеративными механизмами клетки.

В работе впервые была осуществлена сверхэкспрессия одной из 13 циклоРНК гена *SGMS1* — *circSGMS1_7*, содержащей участок кодирующей и 5'-нетранслируемой области данного гена. Экспрессионная конструкция, включающая вставку с искусственно созданными инвертированными повторами по ~800 п.н. с двух сторон от циклоРНК-последовательности, была клонирована в плазмиду рсDNA3.1(+) и трансфицирована в клетки HEK293. В результате, по данным ОТ-ПЦР в реальном времени, увеличение экспрессии *circSGMS1_7* составило 58 раз относительно ее исходного уровня в клетках. При этом котрансфекция синтетического РНК-мимика малой интерферирующей РНК *si-SGMS1_7* снизила уровень сверхэкспрессии циклоРНК в 4 раза.

В числе микроРНК, потенциально способных взаимодействовать с *circSGMS1_7*, с помощью базы данных STarMirDB была выбрана *hsa-mir-4669*. С использованием репортерной конструкции, содержащей слитый с последовательностью циклоРНК ген люциферазы, мы показали снижение активности фермента в 5 и 1,7 раз при введении мимиков *si-SGMS1_7* и *hsa-mir-4669* соответственно. При этом сверхэкспрессия *circSGMS1_7* в системе препятствовала снижению активности фермента. Результат является первым экспериментальным свидетельством взаимодействия малых РНК с циклоРНК гена *SGMS1* человека.

Таким образом, экспрессионная система циклоРНК гена *SGMS1* может быть использована для изучения механизмов внутриклеточной регуляции с участием циклоРНК и малых РНК. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-34-70048.

Литература:

1. Hansen T.B., Jensen T.I., Clausen B.H. et al. Nature. 2013. V. 495. № 7441. P. 384–8.
2. Filippenkov I.B., Sudarkina O.Y., Limborska et al. RNA Biol. 2015. V. 12. № 9. P. 1030–42.
3. Filippenkov I.B., Sudarkina O.Y., Limborska et al. Gene. 2018. V. 654. P. 14–2.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ ТКАНИ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ НАЛИЧИИ СОПУТСТВУЮЩИХ ПЕЧЕНОЧНЫХ ПАТОЛОГИЙ

С.А. Родимова^{1,2}, Н.В. Бобров^{1,3}, И.Д. Щечкин^{1,2}, Д.П. Крылов^{1,2}, Д.С. Козлов^{1,2}, В.В. Елагин¹, М.М. Карabut¹, А.М. Можеров¹, В.Е. Загайнов^{1,3}, Е.В. Загайнова^{1,2} Д.С. Кузнецова^{1,2}

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² ННГУ им. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия

e-mail: srodimova123@gmail.com

Ключевые слова: регенерация печени, стеатоз, фиброз, мультифотонная микроскопия, ГВГ, FLIM.

Хирургическая резекция печени остается наиболее эффективным методом лечения необратимых очаговых заболеваний печени [1]. Однако при наличии сопутствующих печеночных патологий регенераторный потенциал печени значительно снижается [2]. Стандартные клинические методы не позволяют прогнозировать функцию оставшейся после резекции печени. Современные label-free методы мультифотонной микроскопии с режимами время-разрешенной микроскопии (FLIM) и генерации второй оптической гармоники (ГВГ) расширяют возможности изучения структурно-функционального состояния ткани печени на клеточном уровне [3]. Таким образом, актуальной задачей остается поиск критериев для проведения интраоперационной экспресс оценки регенераторного потенциала печени при наличии сопутствующих печеночных патологий.

Серии экспериментов проводились на крысах линии Wistar. На разных этапах развития токсического фиброза (инъекции СС14) и стеатоза (60% высоко-жировая диета) индуцировали регенераторный процесс путем резекции 70% печени. Анализ структуры ткани печени проводили методом мультифотонной микроскопии на 3 и 7 дней после резекции. С применением FLIM определяли вклады времен жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАДН и НАДФН. В качестве контроля проводили морфологический анализ и стандартный биохимический анализ крови.

В результате были выявлены особенности структурно-функционального состояния на разных этапах регенерации при наличии стеатоза и фиброза. При стеатозе были выявлены зоны со сниженным сигналом автофлуоресценции НАДН, соответствующие очагам липидной инфильтрации или фиброзированию. Также показано снижение вкладов связанной формы НАДН и НАДФН уже на ранних этапах стеатоза. При регенерации на фоне стеатоза не наблюдалось резкого увеличения вкладов связанной формы НАДН и НАДФН на 3 сутки после резекции, которое было обнаружено при нормальной регенерации. Это может быть следствием митохондриальной дисфункцией гепатоцитов. При фиброзе выявлены зоны со сниженным сигналом автофлуоресценции НАДН, которые соответствовали только зонам фиброзированию. Также показано резкое снижение вкладов связанной формы НАДН и НАДФН на ранних этапах патологии с последующим повышением данных параметров на поздних этапах. Такие изменения связаны с митохондриальной дисфункцией на ранних стадиях и прогрессированием компенсаторных процессов на поздних этапах патологии. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта

РНФ № 19-15-00263 (метаболический имиджинг, анализ FLIM данных) и гранта РНФ № 22-25-00098 (морфологический анализ образцов печени).

Литература:

1. Ramos E., Torras J., Lladó L. et al. *Hpb*. 2016. V 18. P. 389.
2. De Meijer V.E., Kalish B.T., Puder M. et al. *J. Brit. Surg.* 2010. V. 97. P. 1331.
3. Roberts M.S., Dancik Y., Prow T.W. et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011. V. 77. P. 469.

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА АМИСУЛЬПРИД НА ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА В МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА — КРЫС ЛИНИИ OXYS

А.Я. Родной, К.А. Молобекова, Е.М. Кондаурова, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова, В.С. Науменко

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, серотонин, крысы OXYS, амисульприд, Tau-белок, 5-HT₇ рецептор.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции по всему миру, а процент людей с деменцией, вызванной БА, резко возрастает с возрастом [1]. Серотонин (5-HT) мозга является ключевым элементом во многих физиологических процессах и формах поведения. 5-HT₇ рецептор — один из последних описанных 5-HT рецепторов, а его стимуляция в гиппокампе приводит к повышению синаптической плотности и длины нейритов, которые также зависят от CDK5 — основной киназы, вовлеченной в патологическое фосфорилирование тау-белка. Это указывает на вовлеченность 5-HT₇ рецепторов в регуляцию фосфорилирования тау-белка, его диссоциацию и дальнейшую агрегацию при БА. Эта идея была развита из тех соображений, что конститутивная активация 5-HT₇ рецепторов приводит к повышению активности CDK5 и чрезмерному фосфорилированию тау-белка с формированием нерастворимых агрегатов. И напротив, ингибирование активности 5-HT₇ рецепторов его антагонистами приводит к элиминации данного эффекта [2].

Для дальнейшего подтверждения этой идеи мы исследовали эффект амисульприда — антагониста 5-HT₇ рецепторов, на гиперфосфорилирование тау-белка и на функциональное состояние 5-HT системы мозга у крыс OXYS, являющихся моделью спорадической формы БА. Эксперимент был проведен на 1-, 3- и 6-месячных животных, которым вводили антагонист 5-HT₇ рецепторов амисульприд (Solian, Sanofi-Avensis France) в течение трех недель (ip., 3мг/кг).

Показано, что хроническое введение амисульприда влияет на патологическое фосфорилирование тау-белка и вызывает значительное снижение соотношения pTau/Tau в гиппокампе 3-месячных крыс. Кроме того, в гиппокампе 3-месячных животных амисульприд вызвал снижение экспрессии CDK5, что, однако, не повлияло на обучение в тесте распознавания нового объекта. При этом был выявлен анксиолитический эффект амисульприда у 3-месячных крыс.

Также было показано возраст-зависимое снижение уровня мРНК 5-HT₇ рецепторов во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS. Однако, по данным литературы

такое снижение уровня 5-HT₇ рецепторов, вероятно, связано с возрастом, а не с тау-патологией. Кроме того, было выявлено возраст-зависимое повышение уровня Тау и pТау во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS, по-видимому, связанное с тау-патологией у исследованных животных.

Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом #FWNR-2022-0023. Исследование было поддержано Российским научным фондом, грант № 22-15-00011.

Литература:

1. 2020 Alzheimer`s disease facts and figures. Alzheimer`s & dementia: the journal of the Alzheimer`s Association 2020.
2. Labus J, Rohrs K, Ackmann J et al. Progress in neurobiology 2020, 101900.

АНАЛИЗ СОСТАВА ГИДРОГЕЛЯ ИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

М.В. Руснак¹, Л.И. Калюжная^{1,2}, А.А. Кондратенко², Д.В. Товпеко²

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

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

e-mail: maksimrusnak055@gmail.com

Ключевые слова: гидрогель, внеклеточный матрикс, пуповина человека, регенеративная медицина, тканевая инженерия.

Гидрогели на основе внеклеточного матрикса показали высокую эффективность в клинических испытаниях *in vivo*, способствуя восстановлению функциональных тканей [1]. Пуповина человека является одним из наиболее перспективных биоматериалов, имея ряд преимуществ, таких как большое количество факторов роста, преобладание противовоспалительных цитокинов, высокое содержание гликозаминогликанов [2].

Исследуемый гидрогель был изготовлен и запатентован в научно-исследовательском центре Военно-медицинской академии [3]. Из нативной пуповины человека удаляли сосуды, далее полученный образец гомогенизировали и децеллюляризировали с помощью 0,2 N раствора NaOH. Бесклеточный матрикс солиubilizировали в растворе солянокислого пепсина (1 мг/мл), нейтрализовали, добавляли раствор 10xPBS и лиофилизировали для длительного сохранения.

Анализ состава готового продукта проводили методами гистологического окрашивания, электронной микроскопии и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС).

Гидрогель заливали в парафин, изготавливали срезы и окрашивали препарат альциановым синим, pH 2,5 (Бивитрум, Россия) по инструкции производителя, оценивали результаты в проходящем свете. Согласно данным световой микроскопии, готовый продукт сохраняет гликозаминогликаны, высокое содержание которых является специфической особенностью пуповины человека.

Наличие фрагментов коллагена, возникающих в результате обработки пепсином при изготовлении гидрогеля, показала трансмиссионная электронная микроскопия.

Сравнение спектров поглощения инфракрасного излучения нативной пуповины и гидрогеля показало схожесть их профилей (коэффициент корреляции Пирсона = 0,99).

Изготовленный тканеинженерный продукт сохраняет компонентное преимущество фетальной ткани пуповины человека (коллагены и гликозаминогликаны) что подтверждается проведенными в этой работе исследованиями. Гидрогель из внеклеточного матрикса пуповины человека является многообещающим продуктом, способным решить многие вопросы регенеративной медицины, включая заживление глубоких повреждений кожи и суставного хряща.

Литература:

1. Dubus M. et al. Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. 828424.
2. Dan P. et al. Acta Biomaterialia J. 2017. V. 48. P. 227–237.
3. Патент на изобретение № 2745995. Приоритет изобретения 16 сентября 2020 г.

ИММУНОФЕНОТИП НК-КЛЕТОК ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

В.А. Рыбачук^{1,2}, Н.В. Михайловский¹, Л.И. Попова¹, А.П. Петрикина¹, Е.В. Абакушина¹

¹ ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: rybachuk2016@list.ru

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия, экспансия НК-клеток.

Современные подходы лечения онкологических больных, включают в себя метод адаптивной иммунотерапии, основанный на трансплантации больному аутологичных или аллогенных активированных клеточных препаратов на основе Т- или НК-клеток [1]. Для эффективной активации и экспансии НК-клеток необходимо подобрать условия для их культивирования, которые могут включать в себя ко-стимулирующие факторы (цитокины, антитела) и/или фидерные клетки, а также длительность культивирования [1, 2].

Целью данного исследования явилась оценка пролиферативной активности и иммунофенотипа НК-клеток здоровых доноров в процессе длительной экспансии.

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови 4 условно здоровых доноров по стандартной методике и кокультивировали с фидерными клетками линии K-562 в течение 20 дней в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением ИЛ-2 (ронколейкин, «БИОТЕХ», Россия) во флаконах, в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C. Подсчет клеток и жизнеспособность осуществляли на автоматическом анализаторе TC10 (BioRad, Сингапур) каждые 10 дней. Индекс пролиферации (ИП) определяли как отношение общего числа клеток на 20 день к количеству клеток до начала культивирования. Цитофлуориметрический анализ проводили на 0, 10 и 20 дни экспансии на проточном цитометре с визуализацией Image Stream MkII («Luminex», США). Применяли 6-цветную панель меченых антител к CD45/3/56/16 и маркерам активации CD38/HLA-DR («BD Biosciences», США). Статистический анализ осуществляли с помощью «MS Excel 2016».

Средний ИП НК-клеток на 20 день культивирования составил — 107. В процессе экспансии происходила

перегруппировка основных популяций NK- и Т-клеток. На 20 день культивирования среднее содержание NK-клеток увеличилось в 5 раз до 69,7% ($p < 0,05$), а Т-клеток снизилось в 2,6 раз до 26,8%. При этом более 75% NK-клеток имели фенотип CD56+CD16+, также наблюдалось увеличение экспрессии маркеров активации CD38+ и HLA-DR+ до 92,3% и 96,9% соответственно, что подтверждает процесс активации *in vitro*.

Таким образом, длительное культивирование мононуклеарных клеток в присутствии цитокина и фидерных клеток позволяет многократно увеличить количество и долю активированных NK-клеток. Данную технологию можно использовать для производства клеточного продукта.

Литература:

1. Laskowski, T.J., Biederstädt, A. & Rezvani, K. *Nat. Rev. Cancer*. 2022. P. 1–19
2. Abakushina E.V., Popova L., Zamyatin A., et al. *Vaccines*. 2021. V. 9. № 11. P. 1363.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ВРОЖДЕННОГО БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

И.И. Рюмина¹, Д.Н. Силачев¹, Н.М. Марычева^{1,3}, Д.Ю. Трофимов¹, Ю.Ю. Коталевская^{2,3}, В.В. Зубков¹, Г.Т. Сухих¹

¹ ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва, Россия

² ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³ Благотворительный фонд помощи детям, страдающим заболеванием буллезный эпидермолиз «БЭЛА. Дети-бабочки», Москва, Россия

e-mail: i_ryumina@oparina4.ru

Ключевые слова: новорожденные, врожденный буллезный эпидермолиз, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки.

Буллезный эпидермолиз (БЭ) — клинически и генетически гетерогенное наследственное нарушение структуры кожи, которое связано с разрушением дермо-эпидермального соединения или базального слоя эпидермиса, что приводит к повышенной уязвимости кожи к механическому воздействию [1]. Клинически БЭ проявляется появлением пузырей (булл), которые вскрываются, оставляя болезненные, длительно незаживающие эрозии и рубцы. В настоящее время ведутся исследования по лечению БЭ по нескольким направлениям: генная, протеиновая (белковая) и клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (ММСК), полученными из костного мозга. ММСК способны дифференцироваться в эпителиальные клетки, и могут способствовать заживлению поврежденной кожной покрова [2]. 19 новорожденным с дистрофической рецессивной формой БЭ проводили лечение ММСК, которые получали из ткани плаценты. Образцы ткани инкубировали с 0,5% раствором коллагеназы I типа, в течение 3–4 ч при 37°C. Полученную суспензию осаждали центрифугированием (3000 об/мин) в течение 3 мин, а образовавшийся осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в полной питательной среде, высаживали на полистирольные матрасы и инкубировали в течение 2–3 суток. По достижении 70–80% конфлюэнтности клетки подвергали трипсинолизу с целью пересадки на новые культуральные матрасы

(Corning T-150, США) для дальнейшего наращивания клеточной массы. Для трансплантации пациенту использовались клетки, культивируемые до третьего пассажа. Перед трансплантацией проводили процедуру фенотипирования на стандартные маркеры CD90, CD73, CD105, CD45, CD14, CD20, а также оценивали жизнеспособность клеток, проводя окраску аликвоты клеток (10 мкл) трипановым синим и проводя анализ с помощью счетчика клеток. Трансплантацию ММСК проводили системным способом (внутривенно) в 10 мл физиологического раствора в течение 10 минут, доза клеток составляла $3 \cdot 10^6$ клеток/кг веса пациента. Предварительные данные свидетельствуют о терапевтической активности трансплантированных ММСК. У всех пациентов улучшилось общее состояние, сократилась длительность эпителизации эрозий, уменьшалось количество вновь появившихся пузырей, уменьшились беспокойство и болезненность при проведении регулярных перевязок. Необходимы дальнейшие исследования, для изучения потенциальных эффектов трансплантации ММСК на регенеративные процессы в коже при БЭ.

Литература:

1. Lucky A.W., Whalen J., Rowe S., Marathe K.S., Gorell E. *Neoreviews* (2021) 22 (7): e438–e451.
2. El-Darouti M, Fawzy M, Amin I, Abdel Hay R, Hegazy R, Gabr H, El Maadawi Z. *Dermatol Ther*. 2016 Mar-Apr;29(2):96–100. doi: 10.1111/dth.12305.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИЧЕСКИМИ ОЖОГАМИ

М.Г. Рябков, М.Н. Егорихина, И.Ю. Арефьев, И.Н. Чарыкова, Н.А. Колошеин, А.Е. Богданова, А.О. Московченко, Н.Г. Засецкая

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия

e-mail: maxim-ryabkov@yandex.ru

Ключевые слова: жировая ткань, стромально-васкулярная фракция, мезенхимальные стволовые клетки, биомедицинская технология, ожоги, донорские раны, аутодемопластика.

Целесообразность применения продуктов из жировой ткани, содержащих мезенхимальные стволовые клетки, для лечения ран патогенетически обоснована [1, 2]. Важный фактор, сдерживающий широкое использование продуктов из аутологичной жировой ткани в практике комбустиологии — дефицит безопасных биомедицинских технологий, адаптированных к специфике пациентов с глубокими ожогами [3, 4]. Цель работы — оценить безопасность и эффективность биомедицинской технологии трансплантации стромально-васкулярной фракции жировой ткани для заживления ран донорской зоны у пациентов с ожогами III степени.

Материал и методы. В проспективное плацебо-контролируемое клиническое исследование включены 38 пациентов с термическими ожогами кожи III степени на площади 35 [30; 55]% поверхности тела. Проведены липосакция, ферментное выделение стромально-васкулярной фракции с мезенхимальными стволовыми клетками, внутридермальное введение препарата в исследуемый участок и плацебо в контрольный участок раны донорской зоны, через 10 суток — неинвазивный (теваметрия, кутометрия) и инвазивный (биопсия) контроль.

Результаты. В послеоперационном периоде зафиксированы 5 «нежелательных явлений», связанных с проведенными в рамках исследования манипуляциями: местные реакции I-II классов по Clavien-Dindo в области липосакции [3], в области введения препарата [2]. Эпителлизация ран донорской зоны на 10 сутки зафиксирована у всех пациентов. Функциональные характеристики кожи на исследуемом и контрольном участках ран различались по параметрам трансдермальной потери жидкости и не различались по параметрам эластичности. Гистоморфометрия показала, что суммарная толщина эпидермиса и дермы в исследуемых участках ран была на 22% больше, в контрольных участках ран ($p=0,046$).

Заключение. Трансплантация стромально-васкулярной фракции аутологичной жировой ткани в раны донорской зоны у пациентов с ожогами не вызвала реакций и осложнений у 87% пациентов, сопровождалась незначительными местными реакциями I-II классов по Clavien-Dindo в области липосакции — у 8% пациентов, в области инъекции — у 5% пациентов. Эффект трансплантации проявился достоверным снижением трансдермальной потери воды и увеличением толщины новообразованной кожи в ранах донорской зоны.

Работа выполнена в рамках реализации «Приоритет-2030».

Литература:

1. Арцимович И.В., Зиновьев Е.В., Гостимский А.В. и др. Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. — 2021. — Т. 9. — № 2. — С. 175–181.
2. Гатиатулина Е.Р., Мантурова Н.Е., Димов Г.П. и др. Пластическая хирургия и эстетическая медицина. 2019; 2: 43–48.
3. Rangatchew F., Vester-Glowinski P., Rasmussen B.S., et al. *Burns*. 2021;47(2): 270–294.
4. Momeni M., Fallah N., Vajouri A., et al. *Burns*. 2019;45(4): 914–922.

КЛЕТКИ РАННИХ СТРОМАЛЬНЫХ ПАССАЖЕЙ ИЗ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРОИЗВОДНЫЕ ОРГАНОИДНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЭКСПРЕССИРУЮТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ

**В.М. Рябов¹, М.М. Барышев²,
М.А. Воскресенский³, Б.В. Попов¹**

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт Микробиологии и Вирусологии, Рижский Университет им. Страдиньша, Рига, Латвия

³ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: borisvp478@gmail.com

Ключевые слова: органоидные, первичные стромальные и эпителиальные культуры предстательной железы человека, эпителиально-мезенхимный переход, рак предстательной железы.

Рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется в течение жизни у каждого восьмого лица мужского пола. Во многих случаях РПЖ протекает в дремлющей форме, не требующей активной терапии. Однако в некоторых случаях болезнь трансформируется в агрессивную метастатическую форму, устойчивую к лекарственной терапии и неизбежно приводящую к быстрой смерти пациента. Различные формы РПЖ могут происходить из разных

типов эпителиальных клеток ПЖ, которые представлены популяциями базальных, люминальных, промежуточных, и нейроэндокринных клеток. Молекулярные профили разных типов эпителиальных клеток, их способность к дифференцировке, трансдифференцировке и репрограммированию в опухолевые клетки являются объектом изучения во многих биомедицинских лабораториях в настоящее время. Одним из неотложных вопросов для диагностики, лечения, прогноза и исследования патогенеза РПЖ является поиск ранних маркеров перехода дремлющей форма РПЖ в его агрессивную форму.

Для изучения этого вопроса мы использовали модель стромальных культур (СКПЖ) человека и соответствующих органоидных культур (ОК), полученных из опухолевой и нормальной тканей ПЖ, пациентов, оперированных по поводу РПЖ. Технология ОК основана на получении 3D культуры клеток, которые появляются из стволовых клеток и сохраняют все свойства исходной материнской ткани [1]. Мы обнаружили, что ОК могут быть приготовлены из СКПЖ, подразделенных нами на ранние (пассажи 1–3), и поздние (пассажи 4–6). Используя полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), мы нашли, что клетки ранних и поздних СКПЖ, и соответствующие ОК, экспрессируют люминальные (андрогенный рецептор, AR), цитокератин 18 (ЦК18) и базальные (ЦК5, p63) эпителиальные маркеры, продукция которых снижается или исчезает в поздних СКПЖ и производных ОК. СКПЖ ранних пассажей и соответствующие ОК, полученные из опухолевой ткани, продуцируют также маркер РПЖ AMACR, а в половине из них выявляется рекомбинантный маркер РПЖ TMPRSS2-ERG. Такой рекомбинантный мутантный ген идентифицирован нами путем клонирования и секвенирования продуктов ОТ-ПЦР, полученных из опухолевой ткани ПЖ, производных ранних СКПЖ и соответствующих ОК. В опухолевой ткани, соответствующих ранних СКПЖ и ОК нами также выявлена путем ОТ-ПЦР, электрофореза белков и иммуноблотинга со специфическими антителами повышенная продукция белка Ezh2.

Полученные результаты предполагают, что ранние пассажи СКПЖ и соответствующие ОК представляют эффективную преคลินิกую модель для поиска ранних маркеров агрессивной форма РПЖ. Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004 и поддержана внутренним грантом Института цитологии РАН.

Литература:

1. Sato et al., *Gastroenterology*, 2011, V. 141, P. 1762.

ВЛИЯНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ NG2 ПРОТЕОГЛИКАНА ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

**Д.Х. Сабиров, Э.Ф. Давлетшин, А.В. Тимофеева,
Т.В. Пovyшева, Я.О. Мухамедшина**

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: davraniwe@gmail.com

Ключевые слова: NG2, травма спинного мозга, двигательная реабилитация.

Двигательная реабилитация в современной концепции продолжает рассматриваться как достаточно эффективный, легко воспроизводимый и дозируемый способ стимулирования восстановления двигательной функции.

Современная нейрореабилитация больше не заключается лишь в компенсации инвалидности у пациентов с травмой спинного мозга (ТСМ), а направлена на функциональное восстановление двигательной способности за счет использования нейропластичности. Одним из факторов, препятствующих пластичности и восстановлению нейронов, являются NG2-клетки, которые быстро реагируют на повреждение головного и спинного мозга. Эта реакция характеризуется ретракцией клеточных отростков, набуханием клеточного тела и повышенной экспрессией NG2 протеогликана [1, 2]. Целью данного исследования была оценка влияния двигательной реабилитации на экспрессию NG2 протеогликана клетками-продуцентами на различном удалении от эпицентра ТСМ.

Чтобы оценить возможное влияние двигательной реабилитации на экспрессию NG2 протеогликана был проведен иммуногистохимический и молекулярный анализ ткани спинного мозга крысы на разном расстоянии от эпицентра повреждения (4, 7 и 11 мм) в каудальном направлении. Для этого крысам опытной группы наносили дозированную контузионную ТСМ при помощи импактора (1,5 м/с). Крысам контрольной группы моделирование ТСМ не проводили. В качестве маркеров к NG2 экспрессирующим клеткам были использованы антитела к белкам NG2, S100A10, Iba1 и GFAP. Коллокализацию NG2 протеогликана и пан-маркеров клеток астроцитов и микроглии оценивали при помощи коэффициента Пирсона.

Результаты показали различные изменения в экспрессии NG2 протеогликана как клетками микроглии, так и астроцитами на фоне ТСМ и двигательной нагрузки к 30 суткам исследования при удалении от эпицентра повреждения (4, 7 и 11 мм). При этом общий уровень экспрессии NG2, оцениваемый по параметру средней интенсивности свечения данного белка (mean intensity), был ниже в группах с ТСМ при сравнении с интактным контролем. Однако двигательная реабилитация не влияла на данный показатель и между опытной и контрольной группами достоверных различий обнаружено не было. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств гранта Российского научного фонда № 21-75-00016.

Литература:

1. Tan A.M., Zhang W., & Levine J.M. J. of anatomy, V.207(6). P. 717–725.
2. Filous A.R., & Schwab J.M. The American j. of pathology, V.188(1). P. 53–62.

КЛЕТКИ С ФЕНОТИПОМ ПОДОБНЫМ МЕЗЕНХИМНЫМ СТВОЛОВЫМ ИЗ ПОДКОЖНОГО ЖИРА ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ *SARCOPTES SCABIEI/MANGE*

А.А. Савченкова

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

e-mail: redbullshark01@gmail.com

Ключевые слова: подкожный жир, животные, фенотип, мезенхимные стволовые клетки, чесоточный клещ.

Чесотка, вызываемая *Sarcoptes scabiei/mange*, входит в список тропических болезней ВОЗ. Клещ имеет широкий круг хозяев, включая человека, сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Болезнь имеет

зоонозное значение и представляет серьезную проблему для здравоохранения из-за перекрестной передачи между видами. Дифференциальная диагностика на уровне разновидности очень важна для эпидемиологического исследования и разработки будущей программы ликвидации болезни. Поиск клеточной системы, которая способствовала бы поддержанию клеща *in vitro*, представляет интерес для медицины, в том числе ветеринарной. Ранее было продемонстрировано, что клетки с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым (МСК), выделенные из подкожно-жировой ткани (ПЖТ), могут быть контаминированы клещом [1]. Из прижизненной биопсии подкожного жира клинически здоровой собаки были выделены клетки с фенотипом подобным МСК: с фибробластоподобной морфологией, высокими адгезирующими и клонообразующими свойствами и способными при индукции формировать в культуре клетки жировой и костной тканей. МСК культивировали в 2% растворе желатина. Заражали клетки клещом посредством добавления к питательной среде 25 % кондиционной среды из МСК ПЖТ КРС у которых ранее были выявлен клещ на разной стадии своего развития. Анализ образцов зараженных МСК на 5, 10, 15 и 20 сут продемонстрировал размножение клеща в культуре с формированием гнезд, в которых визуализировались разные стадии его развития. Наибольшее число личинок и нимф паразита выявляли на 10 и 15 сут, соответственно. На 15 сут были обнаружены значительные изменения в клеточном монослое с образованием пустот. Можно предположить, что МСК ПЖТ могут быть перспективным материалом в разработке новой клеточной системы для изучения паразита с целью диагностики и лечения чесотки у млекопитающих. Работа выполнена в лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Литература:

1. Савченкова И.П. Сельскохозяйственная биология. 2018. Т.53. №.4. с. 868–875.

ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

**А.В. Садовская^{1, 2}, Н.А. Петинати¹,
Н.М. Капранов¹, Н.И. Дризе¹, А.Н. Васильева¹,
О.А. Алешина¹, Е.Н. Паровичникова¹**

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

e-mail: sadovskaya.sasha@gmail.com

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, интерферон-γ.

При остром лейкозе строма костного мозга претерпевает изменения из-за воздействия опухолевых клеток и химиотерапии. Изучение этих изменений играет важную роль в исследовании патогенеза острых лейкозов и поиске новых целей для терапевтического воздействия, поскольку стромальное микроокружение регулирует активность как нормальных, так и злокачественных гемопоэтических клеток. В организме мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) постоянно получают сигналы от других клеток. Способность МСК реагировать на эти сигналы имеет большое значение, и,

возможно, изменяется у пациентов с лейкозом. Целью работы было изучить изменения в иммунофенотипе МСК и экспрессии ими генов-маркеров активации и дифференцировки при воздействии ИФН γ .

Исследование относительных уровней экспрессии генов (REL) показало значимое повышение REL маркеров активации *HLA-DR* и *IDO-1* после инкубирования с ИФН γ МСК всех исследованных групп: больных в дебюте заболевания (N=26), больных в ремиссии (N=17) и здоровых доноров (N=19). При парном сравнении образцов больных в дебюте и в ремиссии заболевания был выявлен значимо более низкий уровень экспрессии *HLA-DR* после активации в ремиссии. Также во всех группах после активации повышался REL *PPAR γ* , маркера адипогенной дифференцировки, однако в МСК больных в ремиссии он был значимо ниже, чем в дебюте. Уровень экспрессии *SOX9*, маркера хондрогенной дифференцировки, до активации был выше у доноров по сравнению с обеими группами больных. После активации различие между донорами и больными в ремиссии сохранилось, а у больных в дебюте его экспрессия повышалась. Хотя активация значимо не повлияла на REL маркеров остеогенной дифференцировки, *BGLAP* и *SPP-1*, наблюдалась тенденция к повышению экспрессии *SPP-1* при активации МСК больных в ремиссии, она становилась значимо выше, чем в МСК здоровых доноров. REL *BGLAP* доноров был значимо выше, чем у больных обеих групп, до инкубации с ИФН γ . После активации сохранялась разница между МСК доноров и больных в ремиссии. Различия между МСК доноров и пациентов в дебюте острого лейкоза после активации перестали быть достоверными.

Иммунофенотипирование показало повышение после активации средней интенсивности флуоресценции (MFI) ряда маркеров: *HLA-ABC*, *HLA-DR*, *CD90*, *CD274*, *CD54*, а также процента *CD54+* МСК. Все эти белки играют роль в воспалении. При этом различия между группами не было обнаружено. MFI *CD105* (эндоглин) на клетках больных в ремиссии был значимо ниже, чем у доноров, вне зависимости от активации. Это может быть связано с повышенным запросом на пролиферацию стволовых клеток при восстановлении кровотока после терапии. Выявлены изменения физиологической реакции МСК на активацию ИФН γ у пациентов с острыми лейкозами. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00018.

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА И ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ

С.В. Сазонов

¹ Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

e-mail: Prof-SSazonov@yandex.ru

Ключевые слова: клеточная регенерация, пролиферация, клеточный цикл, внутриклеточные сигнальные пути.

Показано, что активность процессов физиологической и репаративной регенерации тканей изменяется при старении организма [1]. Установлены основные закономерности состояния пролиферативных процессов в тканях с разной скоростью клеточного обновления.

При старении организма во всех без исключения тканях уровень пролиферативных процессов снижается. Использование проточной ДНК-цитометрии позволило

установить, что в основе изменения состояния пролиферативных процессов в тканях лежит торможение процессов вступления клеток в митотический цикл и последующего прохождения ими премитотического (G₂) периода клеточного цикла, без изменения скорости прохождения синтетического (S) периода, что проявляется в ткани увеличением числа полиплоидных клеток [2].

Обнаруженные закономерности прослежены не только в организме экспериментальных животных, но и при индукции регенераторных процессов в печени больных хроническим гепатитом из разных возрастных групп [3], в коже у больных атопическим дерматитом [2], при развитии карциномы молочной железы [4]. При индукции регенераторных процессов во всех изученных моделях одним из основных механизмов появления полиплоидных клеток является торможение прохождения клетками G₂ периода. При развитии опухоли в клетках активируются внутриклеточные механизмы, используемые ранее в эмбриогенезе, но заблокированные в более поздние стадии развития. Появление коэкспрессии E- и P-кадгеринов, запуск каскада внутриклеточных сигнальных путей, высвобождение внутриклеточных β и p120-катенинов из кадгерин-катениновых комплексов, запуск сигнального пути Wnt приводит к стимуляции пролиферации и инвазии клеток опухоли [5].

Литература:

1. Сазонов С.В. Сб. науч. трудов. Екатеринбург, Изд.: СВ-96, 1999. С.352.
2. Сазонов С.В. Актовая речь на итоговой научной конференции УГМУ, Екатеринбург, УГМУ, 2022. 40 с.
3. Блинкова Н.Б., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Екатеринбург: Юника, 2017. 106 с.
4. Сазонов С.В., Бриллиант А.А. Германия, Lambert Academic Publishing, 2013, 140 с.
5. Сазонов С.В., Засадкевич Ю.М., Леонтьев С.Л. Екатеринбург: ИМКТ, 2016, 110 с.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ МЕПРИНА КАК СПОСОБ ВЛИЯНИЯ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Е.В. Самойлова, Д.А. Чепурнова, А.Г. Фесенко, А.А. Коротаева

ФГБУ НМИЦК им. Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: erihter@mail.ru

Ключевые слова: меприн, внеклеточный матрикс, коллагены, фибронектин, актинин, эндотоксемия, острое повреждение легких.

Участие металлопротеиназ в процессах повреждения и репарации тканей хорошо известно, однако роль специфических протеиназ в различных фазах регенерации недостаточно изучена. Меприны являются единственными астазиновыми протеиназами, проявляющими функции как в интерстиции, так и на клеточной мембране, поскольку существуют в двух формах, растворимой и мембранно-связанной [1]. Это значительно расширяет ареал их действия. Кроме того, меприны участвуют не только в деградации белков внеклеточного матрикса, но и в образовании зрелых форм фибриллярных белков, что способствует как повреждению, так и регенерации ткани. Являясь проколлагеназами, меприны расщепляют проколлагены I и III типа, превращая их в зрелые белки, способные собираться в коллагеновые фибриллы [2]. В то же время меприны расщепляют белки базальных мембран

внеклеточного матрикса, такие как коллаген IV, нидоген и фибронектин [3]. Меприны также косвенно регулируют ремоделирование внеклеточного матрикса, активируя металлопротеиназу АДAM10 и способствуя расщеплению промателлопротеиназы 9 [4]. Следовательно, регулируя активность мепринов можно влиять на их функции.

Эффекты ингибирования мепринов изучали на моделях эндотоксемии и острого повреждения легких у крыс линии Sprague-Dawley. Эндотоксемия привела к увеличению экспрессии меприна альфа в почках и сердце. Повышение экспрессии коллагенов I, III, IV типов и фибронектина наблюдалось в почечной ткани, а в ткани сердца — коллагенов III и IV типов. Ингибитор мепринов актинонин уменьшил экспрессию как мепринов, так и генов исследуемых белков внеклеточного матрикса, однако степень выраженности действия актинонина в сердце и в почках была разной. Введение актинонина крысам с острым повреждением легких ослабило ЛПС-индуцированное нарушение проницаемости легочной ткани и уменьшило отек легких. Таким образом, ингибирование мепринов может препятствовать прогрессированию патологического процесса в тканях и органах и способствовать их регенерации.

Литература:

1. Sterchi EE, Stocker W, Bond JS. Mol Aspects Med. 2008. V. 29. № 5. P. 309.
2. Broder C, Arnold P, Vadon-Le Goff S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V. 110. № 35. P. 14219.
3. Kruse MN, Becker C, Lottaz D, et al. Biochem J. 2004. V. 378. P. 383.
4. Jefferson T, Keller UA, Bellac C, et al. Cell Mol Life Sci. 2013. V. 70. P. 309.

КОКТЕЙЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ

**А.С. Светозаров¹, Р.А. Абрамович²,
О.Г. Потанина², И.В. Шарутин², А.Н. Воробьев²,
О.В. Меньшова², Е.В. Елизарова²**

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Научно-производственный участок Института регенеративной медицины ИНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: andrejsvetozarov@gmail.com

Ключевые слова: тест-система, фармакотерапия, цитохром P450, фенотипирование, фармацевтическая технология.

«Коктейльные» тест-системы используются для определения индивидуальной активности изоферментов цитохрома группы P450 у пациента. Система состоит из нескольких зондовых препаратов, каждый из которых метаболизируется отдельным ферментом. Через некоторое время после их приёма проводится анализ крови и выявляется остаточное количество введённых веществ и их метаболитов. Показана перспективность диагностических тест-систем для определения фенотипических особенностей метаболизма лекарственных веществ и назначения наиболее эффективной лекарственной терапии. Важной характеристикой «коктейльной» тест-системы является одновременность введения и скорость резорбции активных компонентов, поскольку контрольное время эксперимента отсчитывается с момента введения. Также заслуживает внимания предотвращение взаимодействия между несколькими действующими веществами внутри лекарственной формы.

В рамках данного исследования была разработана универсальная система одновременного введения тестового «коктейля» из четырёх активных фармацевтических субстанций в нетерапевтических дозировках: кофеина, эфавиренза, флурбипрофена, метопролола тартрата, используемых в качестве зондовых препаратов для изоферментов CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, соответственно. Выбранная лекарственная форма — твёрдая желатиновая капсула, содержащая микротаблетки препаратов. В качестве наполнителя таблеток был использован свободно сыпучий двухосновный безводный фосфат кальция.

Разработан единый универсальный технологический процесс для производства микротаблеток различных АФС. Однородность дозирования полученных микротаблеток составила $4,0 \pm 0,3$ %, технологические характеристики соответствовали требованиям ГФ РФ XIV. Установлена возможность одновременного количественного определения всех АФС методом спектроскопии ЯМР и ВЭЖХ. Разработаны и валидированы аналитические методики.

Использование микротаблеток позволило достигнуть быстрого однородного растворения препаратов в течение 20 минут при распадаемости $1,25 \pm 0,01$ мин. Небольшая, относительно смешанных порошков, площадь поверхности микротаблеток обеспечила механическое разделение активных веществ, предотвращая их химическое взаимодействие. Исследована стабильность микротаблеток.

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ФАГОЦИТОВ В КО-КУЛЬТУРЕ С МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

**А.В. Свирская, М.А. Яковлева,
Б.А. Музыченко, Д.Б. Нижегородова**

Учреждение образования Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

e-mail: alesjswirskay@mail.ru

Ключевые слова: гипоксия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, нейтрофилы, макрофаги, хемилюминесценция.

Гипоксия представляет собой патологический процесс, являющийся ключевым механизмом многих заболеваний, при которых нарушаются окислительные реакции. Наряду с этим условия гипоксии могут использоваться при терапевтических подходах, в частности, при протободготовке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для клеточной терапии. Недостаточность исследований эффектов гипоксии на иммуномодулирующие свойства ММСК, в частности на активность фагоцитов, определяет актуальность данного исследования [1].

ММСК человека выделяли из подкожной жировой ткани (n=5) путем ферментативной обработки и культивировали в полной культуральной среде DMEM (Gibco™, United Kingdom) в течение 24 часов в условиях газовой гипоксии (1–2% O₂) с использованием набора Anaerocult A® mini (Millipore, Германия) при 37°C или в условиях нормоксии в CO₂-инкубаторе. Нейтрофилы и макрофаги получали из гепаринизированной венозной крови доноров (n=5) на градиенте плотности. Сокультивирование гипоксических и нормоксических ММСК с нейтрофилами и макрофагами проводили в полной культуральной среде RPMI-1640

(Lonza, Швейцария) в течение 24 и 48 часов, соответственно. Оценку люминол-зависимой и ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат)-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов и макрофагов проводили с помощью хемилюменометра Lum-100 и определяли максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{\max}). Обработка данных проводилась в программе PowerGraph, STATISTICA 8.0.

В сокультуре с гипоксическими ММСК установлено увеличение I_{\max} как спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов до 0,53 (0,33÷1,40) мВ, так и ФМА-стимулированной до 12,46 (6,22÷23,54) мВ относительно ко-культур с ММСК, культивируемых в условиях нормоксии (0,21 (0,10÷0,63) мВ и 4,03 (3,84÷19,44) мВ, соответственно, $p < 0,05$). В то же время в ко-культурах с макрофагами отмечалось повышение ФМА-стимулированной люминол-зависимой хемилюминесценции в присутствии гипоксических ММСК до 8,08 (4,16÷12,00) мВ относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии (1,28 (0,86÷1,70) мВ, $p < 0,05$), при отсутствии статистически значимых изменений в спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции макрофагальных фагоцитов.

Таким образом, пробоподготовка ММСК в условиях гипоксии способствует усилению стимулированной хемилюминесцентной активности нейтрофилов и макрофагов. Результаты исследования согласуются с данными Cassatella и соавт., которые показали, что ММСК могут поддерживать и сохранять жизнеспособность и функции фагоцитов за счет согласованного действия эндогенно продуцируемых интерлейкина 6 и интерферона β , определяющих большинство иммуномодулирующих эффектов [2]. Исследования выполнены в рамках НИР № 05/22 «Антиокислительный и регенеративный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях гипоксии» (грант Министерства образования Республики Беларусь).

Литература:

1. Lapuente J.P., Blazquez-Martinez A., Marco-Brualla J. et al. *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 534.
2. Cassatella M.A., Mosna F., Micheletti A. et al. *Stem Cells*. 2011. V. 29. P. 1008.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В РЕКОНСТРУКЦИИ ГОЛОСОВЫХ СКЛАДКОВ

М.В. Свистушкин¹, А.А. Бакулина², проф. С.В. Старостина¹, проф. А.Б. Шехтер², А.И. Шпичка², А.Л. Файзуллин², А.В. Золотова¹, А.Н. Никифорова¹, проф. В.М. Свистушкин¹, П.С. Тимашев²

¹ Кафедра болезней уха, горла и носа Института Клинической Медицины им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

e-mail: svistushkin_m_v@staff.sechenov.ru

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, голосовые складки, слизистая гортани, рубцевание, клеточная терапия.

Рубцевание голосовых складок (ГС), приводящее к стойкому нарушению голосовой функции, является одной из самых сложных проблем в отоларингологии. В настоящее время, несмотря на существующее разнообразие подходов к лечению, не существует метода для восстановления

структурных и вибрационных характеристик ГС. Разработка методов лечения, основанных на клеточной терапии, открывает новые перспективы в этом направлении.

Целью данного исследования являлось изучение потенциала мезенхимных стромальных клеток (МСК), полученных из костного мозга человека, в восстановлении морфологических и механических характеристик (ГС) при рубцевании *in vivo*.

Экспериментальная модель включала формирование дефекта голосовой связки и имплантацию клеточного продукта через 3 месяца путём инъекции во вторичную рану ГС после иссечения рубца. В эксперименте было задействовано 30 кроликов, которым проводили резекцию средней 1/3 ГС. На основании вида имплантируемого материала были сформированы 4 группы по 6 животных: 1 группа — физиологический раствор, 2 группа — полиэтиленгликоль(ПЭГ)-фибриновый гель, 3 группа — суспензия МСК костного мозга человека, 4 группа — комплекс МСК с ПЭГ-фибриновым гелем, в качестве группы чистого контроля были взяты 6 интактных голосовых складок из биобанка. Для оценки выживаемости клеток 3 животным была имплантирована суспензия МСК человека, трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим зелёный флуоресцирующий белок (GFP) и 3 животным — комплекс МСК и ПЭГ-фибринового геля, содержащим аналогичные клетки. 24 кролика из экспериментальных групп 1–4 выводились из эксперимента через 3 месяца после имплантации клеточной культуры, 6 кроликов — с имплантированными МСК-GFP в суспензии и геле через 3 дня после имплантации.

По результатам морфологических, механических и вибрационных исследований было выявлено, что МСК костного мозга человека способствует регенерации ГС, приближая её морфологические и механические свойства к нативным, не выявлено статистически значимых отличий от интактных голосовых складок ($p = 0,898$ — МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем). Рубцы после клеточной терапии отличаются меньшей толщиной собственной пластинки ГС ($p < 0,05$), восстановлением архитектоники коллагеновых структур ($p < 0,05$ — для МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем). Применение ПЭГ-фибринового геля в качестве клеточного носителя снижает интенсивность интраоперационного кровотечения ($p = 0,03945$), не увеличивает риск дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде (p — от 0,9497 до 1) и уменьшает потерю клеток при имплантации.

Полученные результаты демонстрируют механизмы восстановления голосовых складок при имплантации МСК костного мозга после иссечения рубца, показывая перспективы развития данного направления и необходимость дальнейших исследований.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ КЕЙДЖЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ 3D-ПЕЧАТИ

Н.Г. Седуш¹, А.Е. Крупнин¹, Е.П. Банин¹, М.М. Алексанян², А.Г. Аганесов², С.Н. Чвалун¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБНУ Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

e-mail: Sedush_NG@nrcki.ru

Ключевые слова: биоразлагаемые имплантаты, спондилонд, полилактид, персонализированные медицинские изделия, 3D-печать.

Бурное развитие аддитивных технологий в последнее десятилетие открыло возможность изготовления персонализированных медицинских изделий, в том числе сложной формы, оптимизированных под конкретного пациента. Особенно перспективным направлением представляется получение биоразлагаемых имплантатов, распадающихся в организме после выполнения своей функции на безопасные продукты. Стандартом хирургического лечения пациентов с грыжами межпозвоноковых дисков является дискэктомия. Для создания спондилодеза после дискэктомии применяются межпозвоночные кейджи. В настоящее время в практике применяются неразлагаемые кейджи из титана, керамики и РЕЕК. Однако их использование может быть сопряжено с рядом осложнений в долгосрочном периоде: псевдоартроз, проседание или смещение имплантата, остеопороз и др. Целью настоящего исследования было создание персонализированного биоразлагаемого кейджа на основе полилактида для сращения поясничных позвонков.

На первом этапе по данным КТ пациента создавали трехмерную твердотельную модель сегмента позвоночника, требующего лечения. Далее по полученной модели создавали трехмерную модель персонализированного межтелового кейджа. Форма и размер кейджа в точности соответствовали анатомии позвоночника, а его высота определялась необходимым расстоянием между телами позвонков. Кейдж состоял из внешнего сплошного контура, обеспечивающего несущую способность и прочность изделия, и внутренней пористой части (скаффолда) для прорастания через нее костной ткани. Изделие изготавливали из биоразлагаемого полимера полилактида (PLA) методом FDM-печати на 3D-принтере Picaso Designer PRO 250. Кейдж дополнительно покрывали гидроксиапатитом, который обладает остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами. Механические испытания кейджа на сжатие были проведены на испытательной машине INSTRON 5965 при температуре 37 °С. Установлено, что изделие способно выдерживать усилие как минимум в 500 кг, что гарантирует прочность и целостность имплантата при физиологических нагрузках. Методом 3D-печати также изготавливали необходимую для установки кейджа пластину и винты. Дизайн пластины оптимизировали с применением конечно-элементного моделирования, что позволило создать наиболее ажурную и легкую конструкцию. Для верификации способности оптимизированной пластины выдерживать физиологические нагрузки провели численный анализ напряженно-деформированного состояния при следующих условиях: нагрузка 100 кг, изгибающий момент 700 Н·мм. Установлено, что возникающие напряжения достигали 43 МПа и не превышали предела прочности материала (70 МПа). Таким образом, показано, что метод 3D-печати является перспективным при изготовлении персонализированного кейджа и фиксирующей пластины для спондилодеза.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПЛЕНОЧНЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ХИТИН-ХИТОЗАНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ БИОМАССЫ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Н.М. Семенихина, Д.В. Минаков, А.А. Минакова, Д.А. Филиппенко

ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

e-mail: asu.nii@mail.ru

Ключевые слова: регенеративная медицина, раневые покрытия, хитин, хитозан, культуры клеток, цитотоксичность.

В современной биомедицине при лечении ран особое внимание уделяется использованию нетоксичных, антибактериальных, биосовместимых и биodeградируемых полимерных волокон, таких как, хитин и его производное — хитозан. Альтернативным источником получения хитина может выступать биомасса высших грибов, полученных биотехнологическим способом. В связи с чем, разработка ранозаживляющих композиций на их основе является актуальным направлением исследований [1].

В качестве объектов исследования послужили пленочные материалы, полученные на основе хитин-глюкановых комплексов и их производных, выделенных из биомассы гриба *A. mellea*.

Исследование проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011. При этом оценивали три вида покрытий на основе карбоксиметилированного хитин-глюканового комплекса (1 группа), хитин-глюканового комплекса (2 группа), хитозан-глюканового комплекса (3 группа). Перед исследованием образцы подвергали автоклавированию. Оценку цитотоксичности проводили методом экстракции. В качестве клеточной культуры использовали 5 пассаж дермальных фибробластов, выделенных из кожи человека. При этом предварительно подготавливали монослой клеток, чтобы он достигал не менее 80%.

Качественную оценку клеток проводили путём визуального осмотра окрашенных кристалливиолетом клеток под микроскопом (Nicon). Оценивали изменение морфологии клеток опытных групп и сравнивали с контролем. Количественную оценку (пролиферативную активность) проводили при помощи ХТТ-теста (PanReac Applichem).

В ходе исследований при визуальном осмотре нами было выявлено минимальное количество различий по морфологии между первой и контрольной группами, в частности по характеру расположения клеток. Фибробласты из второй группы изменили свою первоначальную веретеновидную форму на звездчатую и имели неодинаковый размер. Клетки третьей опытной группы не образовывали монослой, располагались отдельными кластерами, но сохраняли ядро.

При проведении ХХТ теста были выявлены схожие результаты после 4 и 6 часов культивирования. При этом максимальные значения были отмечены в контрольной группе, что связано с высокой пролиферативной активностью без воздействия токсических факторов. В опытной группе минимальные значения теста были выявлены в третьей опытной группе, что соответствует хитозан-глюкановому комплексу.

Таким образом, разрабатываемые раневые покрытия на основе хитин-хитозановых комплексов, обладают в той или иной мере степенью токсичности, которая связана в первую очередь с замедлением пролиферации клеток. При этом пленка на основе карбоксиметилированного хитин-глюканового комплекса проявила самую низкую токсичность, в связи с чем, может быть рекомендована для дальнейших испытаний.

Литература:

1. Минакова, А.А. Химические проблемы современности — Донецк, 2022. — С.284–287.

ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ ТРОЙНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ ПЛА-ПЭГ-ПЛА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

А.С. Семкина^{1,2}, Ю.Д. Загоскин², С.Н. Чвалун^{1,2}

¹ *Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия*

² *НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия*

e-mail: anya.semkina.97@bk.ru

Ключевые слова: 3D-биопечать, гидрогели, тройные блок-сополимеры, полилактид, полиэтиленгликоль.

Трехмерная (3D) биопечать — это новая технология в области тканевой инженерии. Возможность быстрого создания сложных биомиметических структур с высокой точностью, за счет послойного наложения, делает ее многообещающим инструментом для создания искусственных тканей или органов. Разработка новых биоматериалов (биочернил) в тканевой инженерии является чрезвычайно актуальной научной задачей. Подходящие материалы должны обладать следующими характеристиками: биосовместимость, структурная стабильность при печати и применении, необходимые механические и реологические свойства, а также иметь возможность нести факторы роста, стимулирующие развитие клеток [1].

Создание биочернил на основе гидрогелей — одно из перспективных направлений в современной науке [1, 2]. В последнее время исследователи уделяют больше внимания стимул-чувствительным гидрогелям, которые изменяют свои свойства при помещении их в физиологические условия. Особый интерес представляют гидрогели на основе блок-сополимеров этиленгликоля в качестве гидрофильного и алифатического эфира в качестве гидрофобных блоков [3].

В рамках данной работы были получены серии тройных блок-сополимеров с использованием катализаторов 1,8-Диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (ДБУ) и октаноата олова (II) на основе кристаллизующихся и аморфных полилактидных блоков со степенями полимеризации от 15 до 60. Соотношение ПЛА/ПЭГ: от 15/104 до 66/104 и от 15/45 до 25/45.

Были приготовлены водные растворы триблок-сополимеров и получены гидрогели с концентрациями от 13 до 30 мас.% и построены фазовые диаграммы перехода золь-гель.

Определено, что для сополимеров с L-лактидным блоком требуется меньшая степень полимеризации по сравнению с сополимерами на основе D,L-лактидного блока, для образования гидрогелей. Найдена зависимость свойств гидрогелей от способа синтеза тройных блок-сополимеров. Так в случае водного раствора на основе триблок-сополимера, полученного с использованием октаноата олова (II), наблюдается золь-гель-золь переход, в отличие от сополимеров синтезированных на ДБУ, что, по всей видимости, связано с различной полидисперсностью гидрофобных блоков. Исследование выполнено за счет средств госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература:

1. Chamkouri, H., Chamkouri M. American Journal of Biomedical Science & Research. 2021. V.11. № 6. P. 485.
2. Kirillova A., Yeazel T.R., Ashghali D. et al. Chemical Reviews. 2021. V. 121. № 18. P.11238.
3. Zhou Y., Cui Y.C., Wang L.Q. Int J Bioprint. 2021. V.7. № 3. P. 140.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ (МСК) ТОРМОЗЯТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИОБЛАСТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЛЛПМД IN VITRO

О.О. Сербина, Е.В. Киселева, Е.С. Васецкий

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

e-mail: olatyeva94@gmail.com

Ключевые слова: МСК, миобласты, ЛЛПМД, Dux4.

В процессе развития лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофии (ЛЛПМД) мышечная ткань дегенерирует с последующим фиброзом. В скелетных мышцах присутствуют МСК, которые могут участвовать как в регенерации, так и в развитии фиброза при повреждении или воспалении мышечной ткани. При повреждении мышцы примигрировавшие МСК из неповрежденных областей могут стимулировать миогенную дифференцировку как за счет трофического действия на пораженный участок ткани, так и за счет слияния с миобластами, а также сами МСК могут дифференцироваться в миогенном направлении, как это было продемонстрировано ранее на МСК крысы [1]. Ранее мы показали, что миобласты от доноров с ЛЛПМД могут стимулировать миграцию МСК. Однако влияние МСК на миобласты в условиях развития ЛЛПМД остается не изученным. Цель настоящей работы — исследовать влияние МСК на дифференцировку миобластов в модельной системе ЛЛПМД in vitro.

Мы показали, что МСК ингибируют миогенную дифференцировку при совместном культивировании здоровых и ЛЛПМД миобластов с МСК в различных соотношениях. Присутствие любого количества МСК снижало индекс слияния; этот эффект был более выражен в миобластах ЛЛПМД. Процент ядер, экспрессирующих маркер миогенной дифференцировки миогенин, также уменьшался в присутствии МСК. Мы так же проверили возможность прямого слияния МСК с миобластами при пролиферации и миогенной дифференцировке с образованием гибридных миотубул. Прямого слияния этих двух типов клеток при совместной культивировании мы не обнаружили. Известно, что миобласты и МСК могут образовывать межклеточные контакты (например, нанотрубочки), по которым могут мигрировать некоторые органеллы, в частности митохондрии. С другой стороны, окислительный стресс, в основном за счет активных форм кислорода, производимых митохондриями миобластов/миотубул, является характерной особенностью ЛЛПМД. Мы проанализировали способность МСК и миобластов обмениваться митохондриями при совместном культивировании. В редких случаях и митохондрии МСК появляются в миотубках, но процент таких миотубул очень мал. Эти результаты свидетельствуют о том, что в условиях модельной системы ЛЛПМД in vitro влияние МСК на регенерацию мышечной ткани за счет прямого слияния или обмена митохондриями имеет минорный вклад.

Таким образом, МСК не сливаются с миобластами с образованием гибридных тубул, ингибируют миогенную дифференцировку, что, по-видимому, приводит к снижению регенерационной способности мышц и имеют негативную роль в мышечной регенерации при ЛЛПМД в нашей системе. Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0016.

Литература:

1. Beier J.P. et al. CellBiol. Int. 2011. V. 35. № 4. P. 397–406.

ДОЗАЗАВИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОГО НЕЙРОГЕНЕЗА И ДЕСКВАМАЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ МЫШЕЙ

В.Г. Сергеев, К.С. Сергеева, М.С. Аникаева

*ФГБОУ ВО Удмуртский государственный
университет, Ижевск, Россия*

e-mail: cellbio@ya.ru

Ключевые слова: обонятельный эпителий, десквамация, липополисахарид.

Обонятельный эпителий млекопитающих отличается уникальной особенностью генерировать нейроны (рецепторные биполярные клетки), чьи отростки формируют обонятельный нерв, проецирующийся в обонятельные луковицы [2]. В физиологических условиях существует «тонкий» баланс между пролиферацией эпителиальных предшественников и их десквамацией, что обеспечивает постоянное обновление клеток обонятельного эпителия, а также способствует поддержанию его одинаковой толщины. Нарушение этого баланса в сторону усиления десквамации эпителия может быть вызвано действием вирусных и бактериальных факторов [1,3]. В настоящее время нет полного представления о молекулярных механизмах, ведущих к нарушению процессов нейрогенеза и десквамации в условиях вирусного или бактериального инфицирования.

10 самцам белых мышей вводили интраназально унилатерально 10 мкл раствора ЛПС в концентрации 1 мг/мл (малая доза; n=5) и 10 мг/мл (большая доза; n=5) в течение 30 дней или стерильный физиологический раствор (контрольная группа; n=9). Иммуногистохимическое исследование криостатных срезов проводили, используя антитела к нестину, и Толл-подобному рецептору-4. Введение ЛПС вызывало усиление десквамации и значительное повышение экспрессии нестина в базальных клетках, и sustentocитах а также в клетках, окружающих Боуменовы железы и кровеносные сосуды в собственной пластинке слизистой. Обнаружен феномен интенсивной экспрессии Толл-подобных рецепторов и нестина в десквамированных клетках обонятельного эпителия. Большие дозы ЛПС приводили к отслаиванию целых пластов обонятельного эпителия и снижению экспрессии нестина в клетках собственной пластинки слизистой. Сделан вывод о опосредованном через Толл-подобные рецепторы ремоделировании цитоскелета sustentocитов, ведущих к разрушению межклеточных контактов и десквамации эпителия, а также о дозозависимости в интенсивности синтеза нестина в стволовых клетках собственной пластинки слизистой оболочки.

Литература:

1. Urata S., Maruyama J., Kishimoto-Urata M. et al. ACS Chem Neurosci. 2021. Vol.17, № 4. P.589–595.
2. Watelet J.B., Katotomichelakis M., Eloy P., et al. B-ENT. 2009. Vol.5 Suppl P.11.
3. Yagi S., Tsukatani T., Yata T. et al. Acta Otolaryngol. 2007. Vol.127ю P.748–753.

ПЕРСПЕКТИВЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ОСТИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРЕТОВ НА ОСНОВЕ ТАНТАЛА

**М.С. Сердобинцев¹, Т.И. Виноградова¹,
А.В. Баранов¹, А.И. Лаврова¹, М.Е. Дьякова¹,
Д.С. Эсмедляева¹, Н.М. Блюм², М.З. Догондзе¹,
А.С. Кафтырев¹, Н.В. Заболотных¹,
И.А. Баулин¹, П.К. Яблонский¹**

¹ *ФГБУ СПб НИИФ Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

² *ООО Межрегиональный лабораторный центр,
Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: vinogradova@spbniif.ru

Ключевые слова: туберкулезный остит, дефект костной ткани; остеорепарация; активность туберкулезного воспаления; квазистатическое электрическое поле; электрет на основе анодного оксида тантала

В ортопедической хирургии в настоящее время проводится поиск факторов и условий, влияющих на течение деструктивных процессов костной ткани и на эффективность восстановительной пластической хирургии [1]. Имплантация электретов на основе анодного оксида тантала с отрицательным зарядом внешней поверхности (далее «электрет»), индуцирующих квазистатическое электрическое поле, в хирургическом лечении ранних стадий дегенеративных заболеваний суставов приводит к выраженному противоболевому эффекту и восстановлению функции пораженных суставов [2].

Исследованы процессы остеорепарации костной ткани у 30 кроликов, которым в дистальном метадиафизе бедренной кости моделировали туберкулезный остит. 3 животных были интактными (группа 1), кролики группы 2 (n=12) с моделированным туберкулезным оститом не получали лечения, 9 кроликам (группа 3) выполнена некрэктомия и пластика дефекта костным аутооттрансплантатом, животным группы 4 (n=9) — некрэктомия и перифокальное введение электрета, индуцирующего квазистатическое электрическое поле и 6 животным (группа 5) осуществлена некрэктомия, аутокостная пластика дефекта и перифокальная имплантация электрета. Животные 3, 4 и 5 группы получали противотуберкулезное лечение. Сроки наблюдения — 1, 2 и 4 месяца после операции. Остеорегенерацию и регресс воспаления оценивали морфологическими и биохимическими методами (ферменты пуринергической системы — активность общей аденозиндезаминазы и ее изоферментов, активность эластазы, уровень реактантов острой фазы: церулоплазмина, гаптоглобина, α 1-кислого гликопротеина и альбумина). Прослежена эволюция туберкулезного воспаления костной ткани в контрольные сроки. При оценке репаративных процессов костной ткани и регресса активности воспалительных изменений установлено, что только сочетание противотуберкулезного лечения, выполненной некрэктомии, пластики постнекрэктомического дефекта аутооттрансплантатом и перифокальной имплантации электрета позволило уже к 2 месяцам наблюдений достичь полный регресс активности туберкулезного процесса в кости и замещения ее дефекта зрелой трабекулярной тканью.

Таким образом, электрическое поле электрета на основе анодного оксида тантала с отрицательным зарядом внешней поверхности в хирургическом лечении экспериментального туберкулезного остита ускоряет процессы остеорепарации и снижает активность туберкулезного воспаления.

Литература:

1. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. J Orthop Surg Res. 2014.V. 9. № 1. P.18.
2. Вансович Д.Ю., Сердобинцев М.С., Усиков В.В., Цололо Я.Б., Мансуров Д.Ш., Спичка А.А., Алиев Б.Г., Вороков А.А. Мед. фарм. Жур. «Пульс». 2021. Т.23. № 3. С. 24–30.

**ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА ТКАНИ
ЗАДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА *IN VITRO*
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ 3D-НОСИТЕЛЯ,
СОДЕРЖАЩЕГО БИОРЕГУЛЯТОР,
ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ СКЛЕРЫ ГЛАЗА**

**Е.В. Сидорский¹, М.С. Краснов¹,
В.П. Ямскова², В.И. Лозинский¹**

¹ ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

² ООО «Институт проблем биорегуляции», Москва, Россия.

e-mail: sneegr@gmail.com

Ключевые слова: биорегуляторы, криогели, 3D-технологии, фибробласты.

Склера обеспечивает внутриглазное давление и является защитным каркасом для тканей глаза. Прочность склеры определяют высокомолекулярные структуры коллагена, эластина, которые синтезируют фибробласты, часть которых является клеточными источниками регенерации, способными к пролиферации и дифференцировке. Именно за их счет происходит быстрая регенерация ткани склеры. Увеличению жизнеспособности фибробластов и сохранению пространственной организации ткани способствует биорегулятор, обнаруженный в склере глаза быка (БР-СК). Его действие характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Основой БР-СК является пептидно-белковый комплекс, в состав которого входят биологически активные пептиды (мол. масса 1300–5100 Да) и изоформа сывороточного альбумина под номером gi | 1351907 в базе данных Uniprot. Ранее было показано, что белковые криогели были успешно использованы в качестве носителей биорегуляторов для индукции регенерации костной ткани. Целью исследования было изучение действия БР-СК, введенного в 3D-носитель, на состояние склеры и тканей заднего отдела глаза (сетчатка, пигментный эпителий, сосудистая оболочка) в условиях стационарного органо-типического культивирования *in vitro*. В качестве носителя биорегулятора использовали криогенно-структурированные губки в виде дисков диаметром 22 мм и высотой 10 мм, приготовленные из белков сыворотки крови КРС. Работа была выполнена на тритонах *Pleurodeles waltl* обоего пола, разведение которых осуществляется в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Исследование проводили на задних секторах глаза, которые культивировали на криогелях, нагруженных БР-СК в диапазоне концентраций 10^{-19} – 10^{-3} мг белка/мл. В качестве контрольных серий изучали задние сектора глаза, которые культивировали на криогелях, не содержащих БР-СК, или которые культивировали без криогелей. Все культуры фиксировали в р-ре формалина на 3-и сут и приготавливали гистологические срезы, окраска гематоксилин-эозином. Гистологическое исследование показало, что только в опытных сериях, в которых задние сектора глаз культивировали на криогелях, натаных БВ-СК в концентрации 10^{-9} , 10^{-11} мг белка/мл

наблюдали отсутствие выраженных изменений деградации тканей заднего сектора: сосудистая оболочка сохранялась плотной, без признаков деградации, сохранялись адгезионные взаимодействия между сетчаткой и пигментным эпителием, в котором пигмент был распределен равномерно и компактно, что свидетельствует о подержании статуса пролиферации и дифференцировки в пигментном эпителии, в также о сохранении структуры интерфоторецепторного матрикса, играющего принципиальную роль в передаче зрительного акта. В склере наблюдали плотное расположение коллагеновых волокон с малозаметными расслоениями и большое количество жизнеспособных фибробластов, подсчет которых на 1 мм^2 среза ткани склеры показал, что в данных опытных сериях их количество было приблизительно вдвое больше по сравнению с другими контрольными сериями. Также следует отметить, что использование криогеля усиливало протекторное действие БР-СК.

**ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ,
ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ОБЕСПЕЧИВАЮТ
НЕЙРОПРОТЕКЦИЮ ПУТЕМ МОДУЛЯЦИИ
ПУТИ R1ZK/АКТ И КАЛЬЦИЕВОЙ
ОСЦИЛЯЦИИ**

**Д.Н. Силачев^{1,3}, Е.А. Туровский², В.В. Головичева¹,
Е.Г. Варламова², Т.И. Данилина¹, К.В. Горюнов³,
Ю.А. Шевцова^{3,5}, И.Б. Певзнер^{1,3}, Л.Д. Зорова^{1,3},
В.А. Бабенко^{1,3}, Е.А. Евтушенко⁴, А.А. Жарикова⁵,
А.А. Хуторненко³, С.И. Ковальчук⁶,
Е.Ю. Плотников^{1,3}, Д.Б. Зоров^{1,3}, Г.Т. Сухих³**

¹ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

³ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

⁴ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ Лаборатория методов биоинформатики в комбинаторной химии и биологии Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: silachev@genebee.msu.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, внеклеточные везикулы, нейропротекция.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) рассматриваются в качестве перспективной терапии острых патологических состояний головного мозга. Предполагается, что основной нейропротекторный механизм реализуется паракринно в том числе и за счет секреции внеклеточных везикул ВВ [1]. В этом исследовании мы предположили, что многоцелевой терапевтический эффект ВВ обусловлен белковым грузом, который может обеспечивать нейропротекцию, и указали на некоторые ключевые механизмы и молекулярные мишени для такой защиты. Изучались механизмы

нейропротекторного действия ВВ в моделях ЧМТ и гипоксии-ишемии новорожденных (ГИ), а также в моделях *in vitro* с использованием первичной культуры нейроглии.

МСК выделяли из послеродовой плаценты человека, кондиционную среду подвергали дифференциальному центрифугированию (10000g, 108000g) и конечный осадок ВВ ресуспендировали в фосфатном буфере.

Курсовое интраназальное введение ВВ значимо снижало объем повреждения головного мозга в двух экспериментальных моделях, что сопровождалось восстановлением сенсомоторных функций, что свидетельствует о влиянии на нейропластичность ВВ. В модели кислородно-глюкозной депривации (КГД) *in vitro* ВВ предотвращали кальциевую перегрузку как нейронов, так и астроцитов и последующую гибель клеток. В смешанной культуре нейроглии ВВ индуцировали опосредованные рецептором инозитол трифосфата (IP3) осцилляцию Ca^{2+} в астроцитах, связанную с адаптацией к перегрузке кальцием не только в астроцитах, но и в совместно культивируемых нейронах, демонстрируя межклеточные положительные взаимодействия между данными клетками. Было показано, что ингибиторы PI3K вортманнин и LY-294002 полностью отменяли защитный эффект ВВ в модели КГД. Это означает, что передача сигналов PI3K/АКТ является одним из основных путей опосредованной ВВ защиты нервных клеток, подвергшихся ишемическому воздействию. Компоненты этого сигнального пути были идентифицированы среди наиболее обогащенных категорий в протеоме ВВ. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00414.

Литература:

1. Reed SL, Escayg A. *Neurobiology of Disease*. 2021. V. 157. P. 105445

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ ПЛЕНОК С ДОБАВЛЕНИЕМ ОЛИГОПЕПТИДОВ И ГЛИКОПРОТЕИНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК

Д.В. Силин, Г.А. Власова, Е.В. Скорб, С.А. Уласевич

Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: silin@infochemistry.ru

Ключевые слова: муцин, полиэлектролитные слои, биосовместимость, клеточная пролиферация.

Одна из основных проблем в регенеративной медицине и биотехнологии — скорость заживления внутренних повреждений (например, при операциях на сосудах). Для её решения используются различные подходы от хирургического вмешательства, до использования материалов на основе синтетических и природных материалов [1–3].

В связи с этим, целью исследования является разработка биосовместимых материалов на основе полиэлектролитов и природного муцина улитки *Helix pomatia* для ускорения регенерации. Основу материалов планируется создать из послойно осажденных полиэлектролитов, в которые для повышения их биосовместимости вводится муцин.

Последовательное осаждение полиэлектролитов проводили на подложке из предварительно обезжиренного стекла. В качестве первого слоя наносили полиэтиленимин (PEI) с последующим осаждением на него полистирол сульфоната (PSS). Каждый слой осаждали в течение 15 мин с последующим промыванием в дистиллированной воде. Муцин улитки *Helix pomatia* добавляли в раствор полимера в концентрации 0,2 мг/мл. Для

дополнительного увеличения биосовместимости слой муцина в некоторых образцах осаждался дополнительно. Биосовместимость клеток исследовали с помощью постнатальных фибробластов человека (ПФЧ) и линии С2С12. (мышечная ткань мышцы)

Предварительные тесты показали, что введение в ростовую среду приготовленного муцина в концентрации 0,2 мг/мл способствует увеличению скорости пролиферации постнатальных фибробластов человека в 1,3 раза по сравнению с контролем. По результатам МТТ-теста наибольший прирост жизнеспособности клеток ПФЧ наблюдали для образцов, к которым добавляли 10 мкл раствора муцина с концентрацией 0,2 мг/мл на 1,5 мл среды роста клеток.

Таким образом, полученные материалы перспективны для разработки ранозаживляющих покрытий, а также могут использоваться в биосовместимых покрытиях на перевязочных материалах для стимуляции остеогенеза. Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 19-79-10244.

Литература:

1. Adikwu M.U., Alozie B.U. *Sci. Res. Essays*. 2007. V. 2. №. 6. С. 195–198.
2. Nishiyama K. et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2015. — V. 79. №. 2. С. 271–279.
3. Allaw M. et al. *Nanomedicine*. 2020. — V. 15. — №. 17. — С. 1671–1685.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНЫХ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНОВ I И V ТИПА

**М.Ю. Сироткина¹, А.К. Зенкова¹,
С.В. Шабельников¹, А.В. Нащекин²,
Ю.А. Нащекина¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: m.s.778321@yandex.ru

Ключевые слова: тканевая инженерия, коллаген I типа, коллаген V типа, гибридные фибриллы, диаметр фибрилл.

Коллаген I типа основной белок внеклеточного матрикса (ВКМ). Он широко применяется в качестве материала для создания тканеинженерных матриц. Усовершенствование характеристик матрицы с сохранением её биомиметичности возможно осуществить путем изменения её микроструктуры. Диаметр коллагеновых фибрилл оказывает влияние на свойства ткани, например, на механические свойства в коже и сухожилиях и уменьшение светорассеяния в строме роговицы. Также существует зависимость пролиферации и адгезии клеток от диаметра фибрилл. *In vivo* диаметр фибрилл коллагена I типа регулируется компонентами ВКМ, среди которых коллаген V типа, который встраивается в фибриллы коллагена I типа, образуя гибридные фибриллы. Молекула коллагена V типа имеет N-концевой участок, который препятствует присоединению к фибрилле новых молекул коллагена I типа и её росту. Однако исследования показывают, что коллаген V типа, лишенный N-концевого участка, хотя и в меньшей степени, ограничивает рост фибрилл [1].

Целью работы является исследование влияния на адгезию, пролиферацию и морфологию клеток композитных матриц на основе коллагена I типа и V типа

с наличием (colV+) и отсутствием (colV-) N-концевого участка. Мы получили коллаген V типа из плаценты человека методом ферментативной экстракции методом минимизирующим его деградацию. Методом ионообменной жидкостной хроматографии осуществляли очистку и разделение коллагена V типа на фракции colV+ и colV-. Целостность белка оценивали методом иммуоблоттинга. Из коллагена I и V типа создавали композитные матрицы colV+ и colV-. Методом сканирующей электронной микроскопии оценивали диаметр фибрилл. С помощью МТТ-теста, световой и флуоресцентной микроскопии, а также обработки изображений при помощи программного обеспечения ImageJ изучили адгезию и пролиферацию клеток и оценили их морфологию на композитных матрицах.

Показано уменьшение диаметра гибридных фибрилл в присутствии коллагена V типа. Для клеток роговицы линии SIRC показано, что матрицы colV+ оказывает отрицательное влияние на адгезию, образцы colV- не оказывают существенного влияния на адгезию. Для матриц colV- показано увеличение пролиферативной активности клеток с максимумом в матрицах с процентным содержанием коллагена V типа 30%. Также показано, что матрицы colV+ способствовали распластанности клеток, напротив colV- отрицательно влияли на распластанность. Коллаген V типа без коллагена I типа оказывает отрицательное влияние на пролиферацию для клеток SIRC и мезенхимных стволовых клеток. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Проект № 21-74-20120).

Литература:

1. Adachi E., Hayashi T. Connect Tissue Res. 1986. V.14. № 4. P. 257–266.

РАЗРАБОТКА БЕСФЕРМЕНТНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ОСТРОВКОВОЙ ТКАНИ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, В.В. Ильницкий, В.И. Севастьянов

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

e-mail: skalink@mail.ru

Ключевые слова: кролики, поджелудочная железа, инкубация, культуры, инсулин.

Успешность аллотрансплантации островков поджелудочной железы (ПЖ) больным сахарным диабетом 1 типа зависит, главным образом, от количества и качества островков, изолируемых из ПЖ посмертных доноров с помощью ферментных препаратов, прежде всего коллагеназы [1]. При этом происходит протеолитическое разрушение внеклеточного матрикса, что приводит к морфофункциональной дезорганизации островковых клеток и значительному снижению конечного антидиабетического эффекта трансплантации островков. В связи с этим актуален поиск способов получения островковой ткани, минимизирующих интенсивность ферментной обработки ПЖ. В настоящей работе изучена возможность неприменения ферментных препаратов при выделении островковой ткани из ПЖ кроликов.

В качестве доноров использовали 60 новорожденных (1–2-дневных) и 12 одномесячных кроликов. После очистки ПЖ от видимых соединительно-тканых сосудистых структур и сосудов панкреатическую ткань измельчали глазными ножницами в течение нескольких минут, после

чего полученные микрофрагменты тщательно промывали холодным раствором Хенкса. Образовавшуюся суспензию инкубировали в среде RPMI при 37°C. Наблюдения за культурами проводили с помощью инвертированного микроскопа, и их образцы на разных сроках инкубации подвергали морфологическому исследованию. Определяли инсулинпродуцирующую активность культур (ИФА). Микроскопический контроль выявил спонтанную гибель и элиминацию экзокринной ткани в инкубируемых микрофрагментах ПЖ новорожденных кроликов и формирование шарообразных или овоидных свободно плавающих структур, в которых при иммуногистохимическом анализе были выявлены эпителиальные клетки с инсулин-позитивными гранулами. Эти данные позволили назвать их флоатирующими островковоподобными культурами (ФОК). Применение описанной технологии для получения культур из ПЖ одномесячных кроликов не позволило получить островковоподобные культуры из-за невозможности избавиться от экзокринной ткани, доля которой у одномесячных кроликов на порядок превышает таковую в неонатальной ПЖ. В связи с этим впервые нами был применен гипертермический режим инкубации (38°C), который привел к быстрой гибели экзокринной ткани. В результате из ПЖ одномесячных кроликов удалось получить ФОК, аналогичные тем, которые были получены из ПЖ новорожденных кроликов. Анализ проб культуральной жидкости, взятых при инкубации ФОК, подтвердил наличие активной секреции инсулина. Таким образом, показана возможность получения островковой ткани из поджелудочной железы кроликов без применения экзогенных ферментов.

Литература:

1. Barton F.B., Rickels M.R., Alejandro R. et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. Diabetes Care. 2012; 35:1436–1445.

АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА I МИТОХОНДРИИ НЕОБХОДИМА ДЛЯ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК В ПЛЮРИПОТЕНТНОЕ СОСТОЯНИЕ: ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АФК ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

Е.В. Скворцова, И.Б. Назаров, Н.Д. Аксенов, А.Н. Томилин, С.А. Синенко

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

e-mail: e.skvortsova@incras.ru

Ключевые слова: Комплекс I ЭТЦ, NDUFS1, NDUFB10, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), активные формы кислорода (АФК), ротенон, антиоксиданты, супероксид-анион.

В процессе репрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) происходят существенные изменения клеточного метаболизма и сигналинга вызванного изменениями сопутствующих окислительно-восстановительных процессов [1, 2]. Мы исследовали роль комплекса-1 (K1) электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий в процессе репрограммирования фибробластов мыши в плюрипотентное состояние. Инактивация основной субъединицы K-1 — NADH-убихиноноксидоредуктазы S1 (NDUFS1) или вспомогательной субъединицы B10 (NDUFB10) вызывала увеличение продукции АФК в соматических и эмбриональных стволовых клетках мыши. Блокирование функций данных NADH-дегидрогеназ также приводит

к подавлению окислительного фосфорилирования и активации гликолиза [3, 4]. Ингибирование K1 с помощью shRNA к NDUFS1 или NDUFB10, или ротенона в течение всего процесса репрограммирования приводит к значительному снижению эффективности репрограммирования. Нами установлено, что уровни АФК сильно коррелируют с количеством митохондрий в процессе репрограммирования. Данные показатели достигают пика к 3-му дню, и резко снижаются к 6-му дню процесса. Снижение антиоксидантами избытка АФК в первые 3 дня репрограммирования значительно повышает эффективность репрограммирования. Однако удаление АФК в течение всего процесса или после 3-го дня репрограммирования значительно подавляет процесс репрограммирования. Мы установили, что снижение уровня АФК в предшественниках ИПСК, имеющих дефицит K1, не восстанавливает, а, напротив, подавляет их репрограммирование. Таким образом, сниженный уровень АФК и подавленное окислительное фосфорилирование существенно препятствует репрограммированию. Повышенный уровень АФК в клетках с нарушенной функцией K-1 не является фактором, обуславливающим снижение эффективности репрограммирования. Наши данные указывают на множественные функции АФК в процессе репрограммирования. Повышенные уровни АФК необходимы на начальном этапе, а их оптимальные уровни необходимы на последующих этапах репрограммирования. Полученные результаты также указывают, что окислительное фосфорилирование необходимо на каждой стадии данного процесса.

Благодарности: Мы благодарим В.В. Зенина и А.Н. Шатрову за помощь в проведении цитофотометрических анализов и Банк клеточных культур ИНЦ РАН за предоставление клеток STO и МСК. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-14-00242.

Литература:

1. Fomes C.D., Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., et al. Cell Metab. 2011. V. 14. № 2. P. 264–71.
2. Sinenko S.A., Starkova T.Y., Kuzmin A.A., Tomilin A.N. Front. Cell. Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 714370.
3. Rafikov, R., Sun, X., Rafikova, O. Redox. Biol. 2015. V. 6. P. 278–286.
4. Ni, Y., Hagraas, M. A., Konstantopoulou, V. Cells. 2019. V. 8. № 10. P. 1149.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ИХ СЕКРЕТОМА

**М.Н. Скрыбина¹, С.С. Джауари¹, А.Л. Примак¹,
Н.А. Басалова^{1,2}, М.А. Кулебякина^{1,2},
В.С. Попов^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}, А.Я. Величко¹,
В.А. Ткачук^{1,2}, М.Н. Карагяур^{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

e-mail: m.karagyaur@mail.ru

Ключевые слова: МСК, секретом, генетическая модификация, редактирование генома

Применение продуктов секреции стволовых клеток для стимуляции процессов обновления и регенерации ткани является перспективным терапевтическим подходом

в регенеративной медицине. Стволовые клетки, в частности, МСК секретируют широкий спектр протективных и прорегенераторных молекул и, благодаря этому, способны обеспечивать выживание поврежденных клеток, подавлять воспаление в очаге повреждения и активировать тканеспецифичные стволовые клетки. В то же время состав секретомы клеток (в том числе и МСК) лабилен и зависит от клеточного пассажа, возраста, здоровья и физиологических особенностей донора. Более того, в состав клеточного секретомы зачастую могут входить факторы, обладающие противоположной активностью, что может снижать или нейтрализовать терапевтическую активность секретомы.

Применение технологий геномной модификации для усиления экспрессии целевых белков и/или микроРНК и подавления экспрессии «нежелательных» молекул с целью усиления терапевтической активности клеточного секретомы выглядит перспективным подходом. Генетическая модификация клеток-продуцентов позволяет решить вопросы низкой продуктивности и стандартизации получаемого бесклеточного биомедицинского продукта, приближая момент его практического использования. При этом подход достаточно безопасен, поскольку используются не сами модифицированные клетки, а лишь продукты их секреции.

Интересным побочным эффектом генетической модификации клеток является более высокая продукция такими клетками мРНК рекомбинантных белков и/или микроРНК в составе внеклеточных везикул (аналог мРНК генной терапии), что позволяет оказывать не только немедленный терапевтический эффект на поврежденную ткань за счет воздействия белков, но и отсроченный эффект через модификацию работы генетической программы целевых клеток.

В нашей работе была осуществлена генетическая модификация мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека с помощью технологий генной терапии *ex vivo* и редактирования генома, что позволило добиться повышения количества ключевых нейротрофических, антиапоптотических и проангиогенных белков и микроРНК в составе секретомы МСК. Мы предполагаем, что секретом таких генетически модифицированных МСК может обладать более выраженным нейропротективным эффектом в моделях *in vivo*, что в настоящее время изучается на модели экспериментальной интрацеребральной гематомы у крыс.

Аналогичным образом генетическая модификация клеток-продуцентов может быть применена для получения секретомы с другими терапевтическими модальностями, например, для стимуляции остеогенеза, заживления раневых дефектов и т.д.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕПРОГРАММИРОВАННЫХ CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ЛЕЧЕНИИ МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Е.Г. Скурихин¹, М.А. Жукова¹, А.М. Дыгай^{1,2}

¹ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

² ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

e-mail: eskurihin@inbox.ru, mashazyk@gmail.com

Ключевые слова: мелкоклеточный рак легкого, стволовые опухолевые клетки, опухолевые клетки, репрограммированные CD8⁺ Т-лимфоциты, клеточная терапия.

Цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты определяют противоопухолевый иммунный ответ при раке легкого, в том числе при мелкоклеточном раке легкого (МКРЛ). Однако опухоль и ее микроокружение оказывают негативное действие на иммунные клетки. Восстановление утраченных CD8⁺ Т-лимфоцитов и их свойств рассматривается как одно из направлений клеточной терапии опухоли. Для повышения активности лимфоцитарного звена противоопухолевого ответа нами был предложен подход к репрограммированию CD8⁺ Т-лимфоцитов, основанный на применении ингибитора MEK1/2 и блокатора контрольной точки PD-1. Избирательная элиминация мишени обеспечивалась предварительным «обучением» CD8⁺ Т-лимфоцитов антиген-презентирующей смесью, содержащей лизат опухолевых клеток и стволовых опухолевых клеток (СОК).

Целью настоящего исследования явилось изучение противоопухолевой активности репрограммированных CD8⁺ Т-лимфоцитов при раке легкого.

Объектом исследования выступали репрограммированные CD8⁺ Т-лимфоциты человека (рчТлимф) и мышей линии C57BL/6 (рмТлимф). Эффекты рчТлимф и рмТлимф были оценены в культуре клеток карциномы легкого Льюис (LLC) и культуре опухолевых клеток и СОК пациентов с МКРЛ; а также в условиях целостного организма у мышей линии C57BL/6 на ортотопической модели LLC и модели спонтанного метастазирования LLC. В исследовании использовались морфометрический и гистологический методы, проточная цитометрия, культуральные методы, клеточный имиджинг, методы исследования митохондриального дыхания и др.

Репрограммирование увеличивало активность митохондриального дыхания и устойчивость к апоптозу CD8⁺ Т-лимфоцитов в культуре клеток LLC и культуре опухолевых клеток и СОК пациента с МКРЛ. При этом репрограммированные клетки приобретали способность мигрировать в легкие мышей при внутривенном введении. На ортотопической модели LLC и на модели спонтанного метастазирования LLC рмТлимф и рчТлимф демонстрировали антиметастатическую и противоопухолевую активность. Мишенью рмТлимф и рчТлимф выступали опухолевые клетки и СОК.

Таким образом, репрограммирование CD8⁺ Т-лимфоцитов ингибированием MAPK/ERK сигналинга через MEK1/2 и блокадой PD-1/PD-L1 сигналинга человеческим моноклональным антителом ниволумабом с целевой направленностью на элиминацию опухолевых клеток и СОК представляет собой перспективный путь повышения эффективности иммунотерапии МКРЛ. Целевым «обучением» CD8⁺ Т-лимфоцитов опухолевыми клетками и СОК пациента с МКРЛ достигается персонализация лечения. Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2020-773.

ОСОБЕННОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МИТОГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Е.А. Сладкова, С.В. Заболотная, Т.А. Михайлик

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

e-mail: sladkova@bsu.edu.ru

Ключевые слова: лимфоциты, лейкоз, митогены, плазмалемма, атомно-силовая микроскопия.

Основной задачей современной медицины является поиск прогностических критериев, позволяющих

выявить ранние признаки активации патологического процесса. Одним из методов, имеющих прогностическое значение при лейкозах, является цитогенетический анализ, требующий присутствия соответствующих митогенов [1]. Кроме того, реакция бласттрансформации на митогены широко применяется для комплексной оценки иммунного статуса больного. Ввиду чего, целью нашего исследования явилось — изучить особенности плазмалеммы лимфоцитов здоровых доноров и больных острым лимфолейкозом (ОЛЛр) в ремиссии при митогенной стимуляции.

Объектом исследования служили лимфоциты больных ОЛЛ в ремиссии, контроль — клетки здоровых доноров. Митогенную стимуляцию осуществляли ФГА. Рельеф клеточной поверхности и её жесткость исследовали на атомно-силовом микроскопе (АСМ).

В лейкоспензиях здоровых доноров при стимуляции ФГА наблюдали появление субпопуляций микроцитов, нормоцитов и бластов. В состоянии ремиссии у больных ОЛЛ под влиянием ФГА микроцитов не обнаружено. Для нормоцитов больных ОЛЛр характерно снижение жесткости клеточной поверхности на 27% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Рельеф поверхности нормоцитов представлен глобулами и инвагинациями. Высота и ширина глобулярных выступов нормоцитов больных ОЛЛр снизились на 39% и 85% ($p < 0,05$) по сравнению с клетками доноров. Жесткость плазмалеммы лимфобластов в группе пациентов с ОЛЛр снижена на 45% ($p < 0,05$). На поверхности клеток наблюдали мелкие остроконечные глобулярные выступы, высота и количество которых снизились на 37% и 23% ($p < 0,05$) по сравнению с бластами доноров.

Установленное в нашем исследовании разнонаправленное влияние ФГА на морфологию и жесткость лимфоцитов, вероятно, связано с разной специфичностью рецепторных комплексов на поверхности клеток здоровых доноров и больных ОЛЛ в ремиссии. Преобразования клеточной поверхности лимфоцитов больных ОЛЛр на фоне снижения её жесткости по сравнению с контролем при воздействии ФГА указывает на различия в работе актиновых и тубулиновых сетей цитоскелета [2].

Полученные результаты расширяют имеющиеся научные данные о морфофизиологических особенностях трансформированных лимфоцитов и наводят на мысль о необходимости дальнейшего изучения влияния митогенов на лимфоциты здоровых доноров и больных лимфопролиферативными заболеваниями с целью получить надежные данные прогностического значения о регенеративных возможностях в процессе лимфопоэза.

Литература:

1. Panagiotis B., Blanca E., Mellink C. et al. *HemeSphere*. J. 2022. V. 6. P. 707.
2. Ymazaki D. *Cancer Sci*. 2005. V. 96. P. 379–386.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ММСК И ФУКОКСАНТИНА НА ФИБРОЗ ПЕЧЕНИ

В.Н. Слаутин^{1,2}, Д.Ю. Гребнев^{1,2}, И.Ю. Маклакова^{1,2}, К.В. Конышев^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия

e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Ключевые слова: фиброз печени, фукоксантин, ММСК.

Риски осложнений, высокие показатели смертности от терминальной стадии фиброза печени побуждают к поиску эффективных способов лечения фиброза печени [1, 2].

Эксперименты проведены на 40 мышах. Фиброз печени моделировали путем внутрибрюшинного введения CCl_4 в количестве 2 мкл/г веса животного в растворе оливкового масла (1:4). Инъекции проводили в течение 6 недель дважды в неделю.

Животные с фиброзом печени были разделены на 4 группы.

1-я группа — вводили 0,2 мл PBS в хвостовую вену.

2-я группа — вводили 1 млн ММСК в хвостовую вену.

3-я группа — фукоксантин per os в количестве 10 мг/кг мыши.

4-я группа — вводили ММСК и фукоксантин.

ММСК были выделены из хориона плаценты мышей.

Для оценки эффективности терапии производилось определение количества клеток, позитивных по MMP-9, MMP-13, TIMP-1, α -SMA на 1 мм² гистологического препарата. Методом ИФА определялось содержание HGF, TGF- β в гомогенате печени. Также оценивалось содержание соединительной ткани с использованием окраски срезов Sirius red и программного обеспечения SIAMS. Количество соединительной ткани выражали в процентах по отношению к общей площади среза.

Установлено, что во 2 и 3 группах произошло снижение содержания соединительной ткани на 31,4% и 19,1% соответственно. При этом сочетанное введение ММСК и фукоксантина (4 группа) приводит к уменьшению данного показателя на 48,3%. При анализе количества α -SMA положительных клеток установлено их снижение во 2–4 группах. Механизм этих изменений обусловлен повышением экспрессии HGF после введения ММСК и снижением уровня TGF- β после введения фукоксантина. Количество клеток MMP-9 и MMP-13 после трансплантации ММСК (во 2 и 3 группах) увеличилось на 35,3% и 24,3% соответственно. Введение фукоксантина не сопровождалось изменением уровня металлопротеиназ. Активность TIMP-1 была ингибирована как после введения фукоксантина, так и после трансплантации ММСК.

Полученные данные свидетельствуют о различных механизмах действия фукоксантина и ММСК на регресс фиброза печени, снижение количества α -SMA-положительных клеток. ММСК оказывают свое действие через повышение экспрессии матричных металлопротеиназ, выработку HGF. Фукоксантин вызывает уменьшение количества соединительной ткани преимущественно через снижение уровня TGF- β . Таким образом, для лечения фиброза печени перспективно использовать комбинацию ММСК и препарата фукоксантин.

Литература:

1. Roehlen N., Crouchet E., Baumert T. Cells. J. 2020. V.9(4). P. 875.
2. Parola M., Pinzani M. Molecular Aspects of Medicine. J. 2019. V65. P.37–55.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПОЯСНО-КОНЕЧНОСТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ R1 И R9

Я.С. Слесаренко¹, И.А. Яковлев^{1,2},
Р.В. Деев^{2,3}, А.А. Исаев²

¹ ООО Генотаргет, Москва, Россия

² ПАО ИСКЧ, Москва, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: slesarenko@genotarget.com

Ключевые слова: поясно-конечностная мышечная дистрофия, ПКМД, ПКМД R1, ПКМД R9, CAPN3, FKRP, генная терапия.

Поясно-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД) — группы мышечных дистрофий, которые поражают мышцы тазобедренного и плечевого пояса. Эта группа включает более 20 различных подтипов, каждый из которых возникает вследствие мутации различных генов [1]. ПКМД R1 (кальпанопатия) является наиболее частой формой и составляет ~30% всех случаев ПКМД. Причина ПКМД R1 — мутация в гене *CAPN3*. Белок CAPN3 является специфичным для скелетных мышц, модулирует активность внутриклеточных киназ, фосфатаз, фосфолипаз, факторов транскрипции и цитоскелетных белков [2]. Другая форма ПКМД — R9, распространённость составляет 6–38% в разных популяциях. ПКМД R9 возникает из-за мутаций в гене *FKRP*, в результате нарушается гликозилирование α -дистрогликана. Это приводит к потере целостности клеточной мембраны, разрушению волокон и прогрессирующей мышечной дегенерации [3].

Целью нашей работы была оценка эффективности плазмид, содержащих трансгены *CAPN3* и *FKRP*, с промоторами CMV (P1) и мышцеспецифичным промотором (P2) в линиях Expi293F и C2C12 для дальнейшей разработки генной терапии.

Для подбора условий трансфекции клетки трансфицировали плазмидой pEGFP-N1с использованием Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, США). Эффективность трансфекции оценивали на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences, США) с использованием ПО NovoExpress (ACEA Biosciences, США). После выбора условий выполняли трансфекцию с плазмидами, содержащими *CAPN3* и *FKRP* под управлением P1 или P2 (GenScript, США). Транскрипцию трансгенов и наличие трансгенного белка анализировали через 48 часов после начала трансфекции с помощью ПЦР-РВ на CFX96 (BioRad, США) с готовой смесью для ПЦР qPCRmix-HS (Евроген, Россия), вестерн-блоттинга.

Мы подтвердили наработку белков CAPN3 и FKRP в трансфицированных клетках. В Expi293F большее количество белков содержалось при использовании промотора P1. Следовое количество — при использовании промотора P2. Это согласуется с более ранними публикациями других научных групп. Для C2C12 показана более высокая экспрессия обоих трансгенов при использовании тканеспецифичного промотора P2. Следующим этапом работы является верификация плазмид в модельных клеточных линиях и сборка конструкций на основе AAV для разработки генно-терапевтических препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.

Литература:

1. Angelini C. Acta Myol. 2020. 39(4):207–217.
2. Huang, Y. et al. Hum. Mol. Genet. 2008.
3. Hanisch F. et al J Neurol 2010. 257(2):300–301.

ФОРМИРОВАНИЕ БИОАКТИВНЫХ КЕРАМИЧЕСКИХ ПОКРЫТИЙ НА ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАХ

И.В. Смирнов, П.В. Смирнова, А.Ю. Тетерина, В.И. Калита, В.С. Комлев

ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

e-mail: baldyriz@gmail.com

Ключевые слова: фосфаты кальция, керамическое покрытие, титановый имплант.

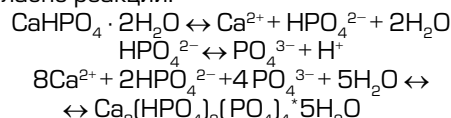
Высокие прочностные характеристики в совокупности с нейтральными биологическими свойствами имплантов на основе титана делают их незаменимыми при замещении дефектов костной ткани в условиях высоких механических нагрузок. Использование имплантов из титана и его сплавов в условиях живого организма не приводит к возникновению реакций отторжения, но возможные коррозионные реакции могут являться причиной вторичных операций. Технологии комбинирования разных материалов в одном изделии, а именно титана и фосфатов кальция (ФК), являются актуальной задачей для исследователей. Такие материалы суммируют положительные свойства друг друга и минимизируют недостатки. Применение фосфатов кальция в виде покрытия на титановый имплант значительно повышает биологические свойства конечного изделия, а именно биосовместимость и остеоинтеграцию.

В данной работе был предложен метод формирования многофазных покрытий на основе различных модификаций фосфатов кальция. Был предложен способ плазменного нанесения покрытий на основе высокотемпературных модификаций ФК гидроксиапатита (ГА) и α -трикальцийфосфата (α -ТКФ) на титановую подложку с промежуточным слоем состава TiCaO с последующей трансформацией поверхностного слоя в низкотемпературный ФК октакальцийфосфат (ОКФ).

Необходимость создания многофазных покрытий заключается в различных свойствах промежуточных слоев. Первый слой на основе TiCaO способствует прочному скреплению титановой подложки с покрытиями ГА и α -ТКФ. Плотноспеченное покрытие на основе слаборезорбируемого материала (ГА и α -ТКФ) препятствует реакциям коррозии титанового импланта. Формирование конечного слоя на основе ОКФ повышает биоактивность, так как ОКФ обладает высокой степенью резорбируемости, является прекурсором биологического гидроксиапатита (ГА) и способствует образованию новой костной ткани в областях с низким регенеративным потенциалом, что способствует быстрому образованию прочной связи между имплантом и костной тканью пациента.

Покрытие на основе ДКФД, играющее роль промежуточного звена для получения ОКФ, получено осаждением из раствора. Раствор, содержащий Ca^{2+} и PO_4^{3-} ионы в необходимых концентрациях, вступает в реакцию с напыленным слоем ГА или α -ТКФ, что приводит к образованию и росту кристаллов ДКФД равномерно по поверхности. Формирование поверхностного слоя на основе ОКФ реализовывали за счет трансформации предварительно

осажденного ДКФД покрытия в условиях буферной системы согласно реакции:



Подход, совмещающий в себе метод плазменного напыления и трансформационные процессы, дает возможность создания покрытий различных составов которые могут быть скомбинированы в различных соотношениях исходя из поставленной задачи.

В данном исследовании разработана методика создания биоактивных покрытий в системах ГА/ОКФ и ТКФ/ОКФ, способных значительно изменить конечные свойства титанового имплантата. Данные покрытия способствуют увеличению остеоинтеграции импланта с костной тканью пациента, уменьшению рисков возникновения повторных операций ввиду повышенного срока службы импланта. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 20-19-00671 «Структура, фазовый состав и механические свойства плазменных композиционных покрытий с новым типом пористой структуры».

ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА ТЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НОХА10 И НОХА11 В СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Смирнова¹, М.А. Кулебякина¹, Р.Ю. Еремичев², Н.А. Александрович², П.И. Макаревич^{1,2}

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

² *Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

e-mail: anast_smir@mail.ru

Ключевые слова: стромальные клетки эндометрия, НОХА10, НОХА11, ферменты семейства ТЕТ, гипоксия.

Эндометрий — одна из немногих тканей человека, обладающая высокой регенеративной способностью. В последние годы появились сведения о том, что для регенерации и обновления эндометрия важны транскрипционные факторы НОХА10 и НОХА11. Эти высококонсервативные гены участвуют в сохранении позиционной информации и постоянства строения тела, а также обеспечивают восстановление тканей и органов после повреждения. На сегодняшний день не известно, какие механизмы обеспечивают поддержание экспрессии генов НОХА10 и НОХА11 в эндометрии, а также их индукцию в ответ на стимулы, возникающие при повреждении (такие как гипоксия). Согласно данным литературы, промоторы генов НОХА10 и НОХА11 подвержены метилированию и деметилированию. Поэтому мы выдвинули гипотезу о том, что экспрессия генов НОХА10 и НОХА11 регулируется системой активного деметилирования ДНК, основными участниками которой являются активностью ферменты семейства ТЕТ (Ten-Eleven-Translocation).

Целью работы было выяснение роли ферментативной активности белков ТЕТ в поддержании и в индукции экспрессии генов НОХА10 и НОХА11 в стромальных клетках (СК) эндометрия человека.

В работе использовали первичные культуры СК эндометрия человека, полученные от молодых (20–30 лет)

здоровых доноров. Влияние активности ферментов семейства TET на экспрессию генов HOXA10 и HOXA11 изучали, добавляя к СК эндометрия селективный ингибитор ферментов TET — Bobcat339 (Sigma-Aldrich, США) — в конечной концентрации 80 мкМ. Для моделирования гипоксии *in vitro* к клеткам добавляли CoCl_2 до конечной концентрации 200 мкМ. После добавления CoCl_2 и/или ингибитора ферментов TET клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 12, 16, 20 и 24 ч. Экспрессию генов HOXA10 и HOXA11 в СК эндометрия измеряли методами ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга.

Согласно полученным результатам, ингибирование ферментов TET приводит спустя сутки к незначительному снижению содержания белка HOXA10 и к возрастанию накопления белка HOXA11 в СК эндометрия. Добавление CoCl_2 приводит к повышению экспрессии HOXA11 как на уровне транскриптов, так и на уровне белкового продукта, а ингибирование ферментов TET препятствует возрастанию экспрессии HOXA11 в ответ на добавление CoCl_2 .

Таким образом, мы показали, что активность ферментов семейства TET необходима для поддержания базального уровня экспрессии генов HOXA10 и HOXA11, а также для возрастания экспрессии HOXA11 в *in vitro* модели гипоксии с использованием CoCl_2 . Ферменты семейства TET регулируют экспрессию гена HOXA11 в СК эндометрия в норме и при гипоксии и поэтому являются важным звеном HOXA11-зависимых механизмов регенерации эндометрия.

РАЗРАБОТКА МИНЕРАЛ-ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ УТРАЧЕННЫХ КОСТНЫХ ТКАНЕЙ

П.В. Смирнова¹, И.В. Смирнов¹, А.Ю. Тетерина¹, В.В. Минайчев², И.С. Фадеева², В.С. Комлев¹

¹ ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: smirnova-imet@mail.ru

Ключевые слова: фосфаты кальция, коллагеновый матрикс, деминерализованный костный матрикс, регенеративная медицина, биоминерализация.

Развитие направления создания биоматериалов приводит в настоящее время на первый план, так называемый регенерационный подход, в котором акцент делается не на замещение дефекта имплантатом с подходящими механическими характеристиками, а на быструю биодеградацию материала и замену его формируемой самим организмом костной тканью [1]. Таким образом, на первое место у таких материалов выходят их биологические и физико-химические свойства, которые существенно зависят от способа их получения [2, 3].

В данной работе был разработан метод осаждения фосфатов кальция на деминерализованные костные матриксы с регулируемым фазовым составом. Покрытия на основе октакальциевого фосфата и дикальцийфосфат дигидрата получали биомиметическим методом в буферных растворах. Было проанализировано влияние условий получения (температура, состав, концентрация, pH) на структуру и свойства полученных материалов. Изучены характеристики покрытий на основе дикальцийфосфат дигидрата

и октакальциевого фосфата и подобран оптимальный метод получения. Разработанные подходы позволяют получить высокоэффективный материал для замещения дефектов костной ткани с выраженными биологическими свойствами. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект No 22-73-00215 «Биоинспирированные минерал-полимерные материалы для направленной регенерации костной ткани»).

Литература:

1. Lopa S., Madry H. Tissue engineering Part A. — 2014. — Т. 20. — №. 15–16. — С. 2052–2076.
2. Mishra R., Bishop, T., Valerio, I. L., Fisher, J. P., Dean, D. Regenerative medicine. — 2016. — Т. 11. — №. 6. — С. 571–587.
3. Winkler T., Sass F.A., Duda G.N., Schmidt-Bleek K. Bone & joint research. — 2018. — Т. 7. — №. 3. — С. 232–243.

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОВОЛОКОН АМИНОВЫМ ПЛАЗМЕННЫМ ПОКРЫТИЕМ, ПОВЫШАЮЩИХ ЭНДОТЕЛИЗАЦИЮ СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ

А.О. Соловьева¹, А.М. Манахов¹

¹ НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: solovevaao@gmail.com

Ключевые слова: эндотелизация сосудистых стентов, аминовые покрытия, биodeградируемые полимерные скаффолды.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти во всем мире. Одним из эффективных терапевтических подходов к терапии сосудистых окклюзий, вызывающих критическую ишемию является шунтирование. Однако, одной из значимых проблем сосудистых имплантов является поздний тромбоз, что приводит к рецидиву окклюзии.

Биорезорбируемые скаффолды имеют существенные преимущества по сравнению со стальными, демонстрируют более низкий риск поздних тромбозов и отсутствие вероятности переломов из-за износа и вторичных механических нагрузок. Сосудистые протезы, изготовленные из синтетических биоразлагаемых полимеров, обладают хорошими механическими свойствами, но часто имеют плохой регенеративный потенциал. Одним из перспективных решений данной проблемы является полное закрытие внутренней поверхности имплантата полноценными функциональными аутологичными эндотелиальными клетками. Заселение внутренней поверхности имплантата эндотелиальными клетками обеспечивает адекватное высвобождение факторов, регулирующих тромбогенез/фибринолиз и активацию (или) ингибирование тромбоцитов эффективно повышает проходимость имплантата [1]. В результате образуется сосудистый эндотелий, который может сохранять антитромботические свойства и ингибировать гиперплазию интимы.

В нашей работе был разработан метод поверхностной модификации поликапролактоновых нановолокон аминогруппами для повышения адгезии, выживаемости пролиферативной активности эндотелиальных клеток. Были протестированы режимы осаждения тонких плазменных полимеров, содержащих NH_2 группы в зависимости от напряжения (от 30 до 60 W) и режима нанесения (постоянный или импульсный разряд). Клетки, посаженные на скаффолд оценивались при помощи окрашиванием

ядер флуоресцентным красителем Hoechst33342, пролиферацию оценивали при помощи набора Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit. Также оценивался митохондриальный потенциал клеток при помощи TMRM Assay Kit.

В результате было продемонстрировано, что модификация аминокислотной поверхности поликапролактона значительно повышает заселение скаффолда эндотелиальными клетками. Причем импульсный режим нанесения полимера позволяет формировать полимерный слой, значительно больше стимулирующий пролиферацию и образование полноценного слоя эндотелиальных клеток.

Таким образом представленная в работе модификация поверхности инертных синтетических волокон аминокислотными группами позволяет значительно повысить скорость заселения их эндотелиальными клетками от пациента, тем самым повысить качество импланта, снизить риск тромбообразования и повысить успешность шунтирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 20-52-26020).

Литература:

1. Goh E.T., Wong E., Farhatnia Y., Tan A., Seifalian A.M. Int. J. Mol. Sci., vol. 16, 1, pp. 597–627, 2015.

МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ TRAIL ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ У КСЕНОГРАФТНОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЙ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**В.В. Соловьева, Т.В. Пухальская,
Д.С. Чулпанова, А.А. Ризванов**

Казанский федеральный университет, Казань,
Россия

e-mail: solovyovavv@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, TRAIL, внеклеточные везикулы, апоптоз, рак молочной железы, терапия онкологических заболеваний.

Лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли (TRAIL) является одним из наиболее перспективных среди терапевтических цитокинов, которые избирательно индуцирует апоптоз в опухолевых клетках. Доставка TRAIL в очаг опухоли с помощью мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток (МСК) представляет интерес в качестве нового метода бесклеточной терапии онкологических заболеваний.

В настоящей работе индуцированные мембранные везикулы (иМВ) из генетически модифицированных МСК-TRAIL получали путем обработки клеток цитохалазином В (Sigma-Aldrich, США). Противоопухолевый эффект иМВ-TRAIL исследовали на ксенографтной модели мышей с аденокарциномой молочной железы. Эксперименты проводили в соответствии с протоколами, утвержденными локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ). Для создания опухолей иммунодефицитным мышам подкожно вводили клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7. При достижении опухоли размера 100 мм³ животным вводили 50 мкг нативных иМВ или иМВ-TRAIL в 20 мкл физраствора, либо 20 мкл физраствора в качестве контроля. Инъекции иМВ осуществляли в область опухоли в течение 12 дней

с интервалом в два дня. Уровень экспрессии апоптотических генов *CAS8*, *BCL-2* и *BAX* и уровень белка *CAS3* в гомогенатах опухоли определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени и вестерн блот анализом.

Было показано увеличение уровня мРНК гена *CAS8* в 1,8 раз в группе мышей, получавших инъекции иМВ-TRAIL, по сравнению с контролем. Экспрессия антиапоптотического гена *BCL-2* в этой же группе животных не изменилась, в то время как уровень мРНК проапоптотического гена *BAX* был увеличен в 1,4 раза, что указывает на активацию апоптотического каскада и индукцию гибели опухолевых клеток. Вестерн блот анализ выявил увеличение уровня ключевого белка апоптоза *CAS3* в 1,7 раз у животных, получавших инъекции иМВ-TRAIL, по сравнению с контролем.

Полученные результаты указывают на то, что иМВ-TRAIL способны активировать внешний сигнальный путь апоптоза и индуцировать гибель опухолевых клеток у мышей с ксенографтной моделью аденокарциномы молочной железы. Таким образом, использование иМВ-TRAIL может стать эффективным инструментом для терапии рака молочной железы. Работа выполнена за счет средств программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и гранта Российского научного фонда № 18-74-10044.

МУТАЦИЯ В ГЕНЕ *GLUD2* ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ КОЛИЧЕСТВА АКТИВНЫХ МИТОХОНДРИЙ В НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

**Д.А. Сорогина^{1,2}, Е.С. Дроздова^{1,2},
Е.В. Григорьева², С.В. Павлова², А.А. Малахова²,
С.П. Медведев², С.М. Закиян²**

¹ Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: d.sorogina@g.nsu.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, нейральная дифференцировка, болезнь Паркинсона, глутаматдегидрогеназа 2-го типа.

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, обусловленное гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга. Наследственная форма БП может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *GLUD2*. Этот ген кодирует митохондриальный фермент глутаматдегидрогеназу 2-го типа, участвующую в окислительном дезаминировании глутамата. Мутация *c.1492T>G* в гене *GLUD2* ведет к усилению работы фермента, что в свою очередь приводит к гибели дофаминергических нейронов [1].

Для изучения фенотипического проявления мутации *c.1492T>G* в гене *GLUD2* были получены линии ИПСК путем репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента мужского пола, гемизиготного по данной мутации. Для получения релевантного типа клеток была проведена направленная дифференцировка ИПСК пациента и условно здоровых людей в астроглиальные клетки и дофаминергические нейроны.

Оценка фенотипического проявления данной мутации проводилась с помощью конфокальной микроскопии

и статистического анализа. Полученные производные окрашивались митотрекером и потенциал-зависимым красителем TMRM. Статистический анализ показал, что в полученной клеточной модели количество активных митохондрий в нейральных производных ИПСК пациента с мутацией достоверно (p -value < 0,05) ниже, чем в контрольных линиях.

Таким образом, мы показали, что мутация в гене *GLUD2*, вероятно, приводит к снижению количества активных митохондрий в астроцитах и дофаминергических нейронах, это может быть связано с перенасыщением цикла Кребса и образованием большого количества АФК. В результате усиленной работы фермента митохондрии разрушаются, что является одной из основных причин развития болезни Паркинсона [2]. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-20063.

Литература:

1. Plaitakis A. et al. Eur. J. Hum. Genet. 2010 183. 2009. Vol. 18. № 3. P. 336–341.
2. Malkus K.A., Tsika E., Ischiropoulos H. Mol. Neurodegener. 2009. Vol. 4. № 1.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ БИОМАРКЕРАМИ НАКОПЛЕНИЯ СЕНЕСЦЕНТНЫХ КЛЕТОК НА СИСТЕМНОМ, ТКАНЕВОМ И КЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ ПРИ СТАРЕНИИ

А.Г. Сорокина¹, Я.А. Орлова^{1,2}, О.А. Григорьева¹, Е.С. Новоселецкая¹, Н.А. Басалова¹, Н.А. Александрушкина¹, М.А. Виговский^{1,2}, К.И. Кириллова¹, А.В. Балацкий¹, Л.М. Самоходская^{1,2}, Н.В. Данилова^{1,2}, У.Д. Дьячкова², В.В. Какоткин², Д.А. Асратян¹, Ж.А. Акопян^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{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

e-mail: drsorokinaag@gmail.com

Ключевые слова: сенесцентные клетки, старение, биомаркер, p16INK4a, скорость пульсовой волны, возраст-ассоциированные заболевания, секреторный фенотип, ассоциированный со старением.

Понимание биологических механизмов процессов старения необходимо для предупреждения и замедления развития возраст-ассоциированных заболеваний (ВАЗ). Одной из ведущих причин старения организма считается накопление в различных тканях т.н. сенесцентных, или стареющих, клеток (СК). Клеточное старение является необходимым для обновления тканей и их регенерации, но избыточное накопление СК приводит к активации хронического асептического воспаления, дисфункции тканей и развитию ВАЗ. В настоящее время активно разрабатываются подходы к селективной элиминации СК, контролю их активности и реверсии сенесцентного состояния [1].

Для оценки вклада СК в развитие старения и патогенез ВАЗ необходимы релевантные и надежные биомаркеры таких клеток. В качестве такого биомаркера часто используется экспрессия ингибиторов клеточного цикла (например, p16/INK4a). В клинической практике маркерами ВАЗ являются жесткость сосудистой стенки, некоторые гемодинамические и метаболические параметры, а также содержание отдельных цитокинов и факторов

роста в крови. В данной работе мы изучали взаимосвязи между установленными клиническими системными биомаркерами старения и развития ВАЗ и биомаркерами СК на тканевом и клеточном уровнях.

В исследование было включено 38 пациентов старше 65 лет (средний возраст $70 \pm 4,9$ лет), у которых проводили оценку традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, жесткости артериальной стенки, а также получали биоматериалы (периферическая кровь, кожа, подкожная жировая клетчатка), из которых затем выделяли различные типы клеток (моноклеарные клетки крови (МНК), фибробласты (ФБ) и мезенхимные стромальные клетки (МСК)), а также проводили гистологический анализ биоптатов с целью оценки различных маркеров СК.

С помощью корреляционного анализа была подтверждена сильная значимая связь экспрессии p16 в тканях с возрастом ($r=0,6$, $p<0,001$), что соответствует литературным данным [2], на организменном уровне выявлена его связь со скоростью пульсовой волны ($r=0,394$, $p=0,015$), уровнем VCAM-1 ($r=0,312$, $p=0,006$) в системном кровотоке и уровнем мРНК p16 в МНК ($r=0,380$, $p=0,046$). Статистически значимые корреляции были выявлены с показателями пролиферации ФБ и МСК в культуре и приобретением клетками секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP): так, уровень p16 значимо коррелировал с уровнем IL-6 (сильная связь) и MCP-1 (слабая связь) в секрете клеток. Результаты многофакторного линейного регрессионного анализа подтвердили, что независимо от возраста с экспрессией p16 связаны показатели пролиферации выделенных клеток и IL-6 в составе SASP.

Таким образом, мы установили наличие взаимосвязей между биомаркерами накопления СК в тканях и в клетках, выделенных из этих тканей в культуру, а также выраженностью клинических биомаркеров старения. Полученные данные необходимы для успешной трансляции в клинику подходов, направленных на регуляцию содержания СК в различных тканях. Исследование выполнено в рамках государственного задания МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова.

ФИБРОБЛАСТЫ, ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ, МАКРОФАГИ ДЕСНЫ У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ ПОСЛЕ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ

Е.М. Сперанская

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

e-mail: ne28@bk.ru

Ключевые слова: фибробласты, макрофаги, тучные клетки, CD68, пародонтит, диодный лазер.

Фибробласты десны участвуют в воспалительных реакциях и ремоделировании структур пародонта за счет продукции цитокинов, которые активируют миграцию тучных клеток и макрофагов, способствуя восстановлению тканей [1, 2, 3, 4].

Целью исследования стало изучение механизмов, направленных на регуляцию численности десневых фибробластов, тучных клеток и макрофагов при хроническом воспалении у людей молодого возраста (20–40 лет).

Материалы и методы. Проанализированы 32 образца десны человека 20–40 лет, полученных при биопсии. Все пациенты были разделены на 3 группы: контрольная

группа — пациенты без воспаления пародонта, группа с воспалением пародонта — пациенты с хроническим пародонтитом легкой/средней степени тяжести, группа после лазеротерапии — пациенты с хроническим пародонтитом после терапии диодным лазером. В исследовании использовали окраску гематоксилином-эозином для выявления фибробластов, окраска полихромным толуидиновым синим по методу Унна для определения тучных клеток. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышинных антител против антигена CD68 (Dako) в разведении 1:100, для подсчета численности макрофагов.

В результате исследования установлено, что тучные клетки и макрофаги располагались по ходу кровеносных сосудов собственной пластинки десны в образцах всех групп. При хроническом воспалении тучные клетки секретировали незрелый гепарин, после лазерного облучения происходило торможение секреторной активности данных клеток. Фибробласты располагались в собственной пластинке десны равномерно.

При хроническом воспалении число фибробластов, тучных клеток, макрофагов было выше, по сравнению с контрольной группой. Воздействие диодного лазера способствовало уменьшению численности фибробластов и увеличению численности тучных клеток и макрофагов.

Заключение. Применение диодного лазера у пациентов 20–40 лет с хроническим воспалением пародонта связано с восстановлением численности фибробластов десны и увеличением числа макрофагов, тучных клеток. Лазерное облучение снижает секреторную активность тучных клеток, способствуя созреванию в них гепарина.

Литература:

1. Boström E.A., Kindstedt E., Sulniute R. et al. PLoS One. 2015. № 10(8). P. e0134608.
2. Ribeiro L.S.F., Dos Santos J.N., Rocha C.A.G. et al. J Histochem Cytochem. 2018. V. 66(6), P. 467–475.
3. Sağlam M, Köseoğlu S, Pekbağrıyanık T. et al. J Cosmet Laser Ther. 2017. V. 19(8). P. 469–474.
4. Basso F.G., Soares D.G., Pansani TN et al. Braz Oral Res. 2016. V. 30(1). P. e122.

БИОСОВМЕСТИМОЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОЕ МЕЖТЕЛОВОЕ ШЕЙНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ШЕЙНЫХ ПОЗВОНКОВ

О.А. Спирин¹, А.Г. Аганесов¹, М.М. Алексанян¹, А.Е. Крупнин², С.А. Макаров¹

¹ ФГБНУ Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: spirinoleg94@gmail.com

Ключевые слова: грыжи межпозвоночных дисков, шейная дискэктомия, межпозвоночный кейдж.

Грыжи межпозвоночных дисков шейного отдела позвоночника являются частой причиной боли в шейном отделе позвоночника, верхних конечностях и вызывают связанную с компрессией невралгических структур патологическую неврологическую симптоматику — 3,3 случая на 1000 человек. Среди данной группы пациентов приблизительно 8–12% нуждаются в оперативном лечении. Стандартом хирургического лечения пациентов с грыжами межпозвоночных дисков шейного отдела позвоночника является передняя шейная дискэктомия [1].

Для создания спондилодеза после дискэктомии применяются межпозвоночные кейджи. Они производятся из высокотемпературного полукристаллического полимера полиэфирэфиркетона (PEEK) или из металла, преимущественно титана. Использование данных имплантов сопровождается риском развития их нестабильности в позднем послеоперационном периоде. Биодegradируемые импланты в течение 6–12 месяцев после операции замещаются собственной костной тканью и за счёт этого минимизируется риск возникновения нестабильности. На мировом рынке существует единственный межтеловой биодegradируемый кейдж, произведенный во Франции в 2009 г. [2], который не получил распространения в связи с высокой стоимостью производства, тогда как на отечественном рынке аналогов нет.

В отделении хирургии позвоночника РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского планируется создание биосовместимого биодegradируемого устройства для стабилизации шейных позвонков при операциях на шейном отделе позвоночника. Разработка данного устройства при операциях на шейном отделе позвоночника позволит улучшить результаты хирургического лечения дегенеративных заболеваний шейного отдела позвоночника и минимизировать риск развития инфекционных осложнений и нестабильности, а именно улучшить показатели формирования корпородеза после операции. Учитывая отсутствие подобных устройств на отечественном рынке, а также лишь один импортный аналог с высокой стоимостью, разработка указанного кейджа является актуальной задачей с позиции импортозамещения. В настоящее время разработан и изготовлен опытный образец кейджа с применением аддитивных технологий, проводятся комплексные испытания для изучения свойств материалов для выбора наиболее подходящего.

Литература:

1. В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, А.А. Калинин [и др.]. Хирургия позвоночника. 2019. Т. 16. № 1. С. 48–56.
2. Debusscher F, Aunoble S, Alsawad Y, Clement D, Le Huec JC. Eur Spine J. 2009 Sep;18(9):1314–20.

ПЕПТИДЫ АКТГ(4-7)РGP (СЕМАКС) И АКТГ(6-9)РGP СПОСОБСТВУЮТ УВЕЛИЧЕНИЮ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОГЛИИ В ПЕРИИНФАРКТНЫХ ЗОНАХ МОЗГА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

В.В. Ставчанский¹, В.В. Южак², Л.Е. Севанькаева², Н.К. Фомина², А.Е. Корецкая², А.Е. Денисова³, И.Б. Филиппенков¹, С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹

¹ ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

e-mail: bacbac@yandex.ru

Ключевые слова: ишемия мозга, нейропротекция, АКТГ(4-7)РGP (семакс), АКТГ(6-9)РGP, tMCAO, морфометрия, иммуногистохимия, поликлональные кроличьи антитела к PCNA

Ишемический инсульт — одно из тяжелейших заболеваний с высокой инвалидизацией и смертностью населения. Для понимания процессов, лежащих в основе повреждения и восстановления неврологических функций после ишемического повреждения головного мозга, а также для исследования протективных свойств лекарственных препаратов активно используется модель обратимой окклюзии средней мозговой артерии (tMCAO). В представленной работе нами проведено гистологическое исследование формирования зон повреждений в головном мозге крыс в условиях tMCAO, а также морфофункциональное изучение сравнительной эффективности двух пептидов меланокортинового ряда — АКТГ(4-7)PGR (семакс) и АКТГ(6-9)PGR на выраженность ишемических повреждений в коре больших полушарий по морфометрическим показателям нейронов, окрашенных по методу Ниссля, и критерию пролиферативной активности нейроглиальных клеток.

В работе была использована модель tMCAO, основанная на эндоваскулярной окклюзии правой средней мозговой артерии (ПСМА) с помощью монофиламента в течение 90 минут и последующего восстановлению кровотока. Патоморфологическое изучение зон ишемического повреждения в головном мозге крыс проводили через 24ч после обратимой окклюзии ПСМА. Количественные характеристики нейронов, использованные при морфометрии, включали объемную плотность нейронов, площадь сечения нейронов, количество нейронов на 1 мм². По данным морфометрии у крыс, подвергнутых tMCAO, после применения семакса и АКТГ(6-9)PGR объемная плотность содержания нейронов и их размеров в перифокальной зоне инфаркта достоверно увеличились по сравнению с крысами, получавшими физраствор.

Иммуногистохимические исследования пролиферативной активности нейроглиальных клеток проводили с использованием поликлональных кроличьих антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA. Через сутки после окклюзии у крыс, получавших пептиды, на препаратах, иммуноокрашенных на PCNA, визуально отмечалась картина пролиферации нейрогениторных клеток в ростральном отделе боковых желудочков, их миграция в зоны ишемического повреждения, а также расширение зон пролиферации нейроглиальных клеток в стриатуме. Количественная плотность пролиферирующих клеток статистически значимо увеличилась в неповрежденной коре и в пенумбре. Таким образом, результаты проведенных нами морфофункциональных и иммуногистохимических исследований позволили объективно верифицировать однонаправленное нейропротективное действие пептидов семакса и АКТГ(6-9)PGR при фокальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00268-П.

ДИСТАНТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОГЕНИТОРНЫХ И ЗРЕЛЫХ КЛЕТОК БОЛЬШОГО САЛЬНИКА ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА НА ЗДОРОВЫЕ КЛЕТКИ ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Ю.С. Стафеев¹, С.С. Мичурина^{1,2}, М.Ю. Агарёва^{1,3}, Е.С. Зубкова¹, И.А. Складник⁴, Е.А. Шестакова⁴, А.О. Гаврилова⁴, М.С. Синеокая⁴, Е.И. Ратнер¹, М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфенова^{1,2}, М.В. Шестакова⁴

¹ ФГБУ НМИЦ кардиологии им. Е.И. Чазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

² МГУ им. М.В. Ломоносова

³ МИРЭА — Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова

⁴ ФГБУ НМИЦ эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

e-mail: yuristafeev@gmail.com

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, адипоциты, сахарный диабет 2 типа, сокультивирование, сальник.

В настоящее время распространенность ожирения и сахарного диабета 2 типа (СД2Т) существенно нарастает и занимает важную позицию в структуре заболеваемости человеческой популяции. Поэтому фундаментальная и клиническая науки в своих исследованиях фокусируются на поиске патогенетических и протективных факторов, которые вовлечены в развитие метаболических нарушений при ожирении. Большой сальник является представителем висцеральной жировой ткани, который существенно вовлечен в увеличение жировой массы при ожирении. Тем не менее, в настоящее время взаимоотношения между прогениторными и зрелыми клетками висцеральной жировой ткани и другими жировыми депо остаются недостаточно изученными. В представленном исследовании мы проанализировали способность висцеральных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани воздействовать на здоровые МСК и адипоциты подкожной жировой ткани

Эксперимент проводили на пулированных культурах МСК подкожной жировой ткани (пМСК) здоровых пациентов и МСК висцеральной жировой ткани (вМСК) пациентов с ожирением и нормальной глюкозной толерантностью (НГТ) или наличием СД2Т. Фенотип поверхностных маркеров клеток был охарактеризован с помощью проточной цитометрии. Сокультивирование осуществляли в системе Transwell, мембрана полиэтилен, диаметр пор 0,4 мкм. Формирование липидных капель оценивали с помощью липофильного красителя BODIPY493/503 и конфокальной микроскопии. Метаболизм клеток после сокультивирования оценивали с помощью радиоактивно меченой ¹⁴C-глюкозы и иммуноблоттинга на маркеры метаболизма липидов и активности митохондрий. Секретом висцеральных МСК ЖТ оценивали с помощью системы мультиплексного анализа цитокинов.

Мы показали что висцеральные МСК ЖТ как НГТ, так и СД2Т больных имеют мезенхимальный фенотип, однако для висцеральных МСК ЖТ в сравнении с подкожными МСК ЖТ была отмечена усиленная экспрессия CD29, а также пониженная экспрессия CD90, CD140b и IGF1R. Совместный адипогенез продемонстрировал

способность висцеральных МСК ЖТ с СД2Т увеличивать липидные капли в составе здоровых адипоцитов, а также стимулировать накопление жирных кислот. Сокультивирование висцеральных МСК ЖТ с здоровыми зрелыми адипоцитами усиливало образование триглицеридов в здоровых адипоцитах, в то время как висцеральные МСК ЖТ НГТ пациентов активировали метаболизм здоровых адипоцитов. Секретом висцеральных МСК ЖТ пациентов с НГТ характеризовался наличием высоких концентраций провоспалительных цитокинов, а также хемоаттрактантов миелоидных клеток и факторов ангиогенеза по сравнению с висцеральными МСК ЖТ с СД2Т.

Таким образом, представленное исследование демонстрирует критически важную роль паракринных взаимодействий между висцеральной и подкожной жировыми тканями как на уровне прогениторных, так и на уровне зрелых клеток. Механизмы данных взаимодействий могут быть различными и два из них продемонстрированы в представленной работе: прямой обмен метаболитами и секреция цитокинов. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00365.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙРОТРОФИНА-3 ПРИ СОВМЕСТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ С КЛЕТКАМИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЕ КИСТЫ СПИННОГО МОЗГА

О.В. Степанова¹, А.Д. Воронова¹, А.В. Чадин¹, Г.А. Фурса¹, Е.К. Карсунцева¹, М.П. Валихов^{1,3}, А.С. Семкина^{1,3}, И.В. Решетов², В.П. Чехонин^{1,3}

¹ ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского МЗ РФ, Москва, Россия

² УКБ № 1 ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: sms-34@yandex.ru

Ключевые слова: нейротрофин-3; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; кисты спинного мозга; клеточная терапия; регенеративная медицина.

Травмы спинного мозга являются причиной формирования кист, которые сдавливают спинной мозг, препятствуют проведению нервных импульсов и нейрорегенерации. Клеточная терапия — перспективная стратегия для лечения посттравматических кист спинного мозга. Как известно, важную роль в регенерации нервной ткани после повреждения играют нейротрофические факторы. Так, нейротрофин-3 (NT-3) может регулировать выживание нейронов, стимулировать рост аксонов, формирование синапсов и другие процессы нейропластичности [1]. Экспрессия нейротрофинов значительно снижена в хронической фазе повреждения спинного мозга, что требует их экзогенного введения [2]. Целью данной работы является оценка эффективности применения NT-3 при совместной трансплантации с клетками обонятельной выстилки в посттравматические кисты спинного мозга.

В исследовании были использованы образцы обонятельной выстилки, полученные при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1. Были получены информированные согласия от всех пациентов. Эксперименты на крысах линии Вистар проводили в соответствии с «Правилами проведения

работ с использованием экспериментальных животных». Все исследования были одобрены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ. Из обонятельной выстилки человека и крыс были получены обкладочные клетки по разработанным нами протоколам [3]. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после экспериментальной травмы спинного мозга крысы. Обкладочные клетки человека и крыс в количестве 750 тысяч и комбинированные препараты из того же количества клеток и NT-3, 500 нг. в образце, трансплантировали в область кист (n=10 для каждого исследуемого образца) через 4 недели после травмы. Контрольной группе вводили среду без клеток (n=10). В течение 4 недель после трансплантации оценивали восстановление подвижности задних конечностей крыс, используя 21-балльную шкалу открытого поля (BBB).

В результате было показано, что NT-3 усиливает эффективность применения обкладочных клеток обонятельной выстилки человека для улучшения подвижности задних конечностей крыс при посттравматических кистах спинного мозга. Эффективность применения NT-3 при совместной трансплантации с обкладочными клетками крыс не была выявлена. Комбинированный препарат из аутологичных обкладочных клеток человека и NT-3 в будущем может применяться в области нейрохирургии для лечения пациентов с посттравматическими кистами спинного мозга. Работа выполнена при поддержке государственного задания № 056-00017-20-00 от 25.12.2019 г.

Литература:

1. Keefe K.M., Sheikh I.S., Smith G.M. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 548. doi:10.3390/ijms18030548.
2. Lin X.-Y., Lai B.-Q., Zeng X. et al. *Cell Transplantation.* 2016. V. 25. P. 1425–1438.
3. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V. et al. *Stem Cells Dev.* 2019. V. 28. № 18. P. 1253–1263.

ВКЛАД ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СЕНСИТИЗАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Д.А. Степанова, В.И. Чечехин, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин

Кафедра биохимии и мол. медицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: stepanova.daria.farm@mail.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гетерологическая сенситизация, норадреналин, серотонин.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) — стволовые клетки стромы, способные к дифференцировке в остеобласты, миоциты, хондроциты, адипоциты, и к паракринной саморегуляции [1]. Ранее мы обнаружили присущий МСК феномен, при котором норадреналин и серотонин вызывают повышение чувствительности тех же клеток к норадреналину, который был назван гетерологической сенситизацией. Цель данной работы: определить вклад паракринных факторов в развитие гетерологической сенситизации МСК.

Сначала мы показали, что смена среды уменьшает степень развития сенситизации, вызванной гормонами. Для этого мы преинкубировали клетки с норадреналином

или серотонином с последующей сменой среды в части лунок. В результате наблюдали повышение числа отвечающих кальцием клеток, подвергшихся длительной инкубации после воздействия гормонами, по сравнению с клетками, которые были отмыты от среды, содержащей паракринные факторы, что означает, что в формировании гетерологической сенситизации принимают участие не только внутриклеточные факторы, но и секретируемые паракринные факторы.

Потом мы показали, что механизм сенситизации зависит от факторов, выделенных клетками в среду, и эти факторы способны стимулировать наивные клетки на повышение их сенситизации. Для этого мы перенесли среду с клеток, стимулированных гормонами, на наивные клетки. В результате наблюдали, что в клетках, инкубированных в среде, содержащей паракринные факторы, наблюдалось повышение числа отвечающих кальцием клеток, по сравнению с наивными клетками, что означает вклад паракринных факторов в сенситизацию. Таким образом, мы можем сделать вывод, что паракринные факторы играют значимую роль в развитии гетерологической сенситизации МСК. Исследование выполнено при поддержке РФФ в рамках проекта № 21-15-00311.

Литература:

1. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M. et al. Regen Med 4, 22 (2019).

ВЛИЯНИЕ НА СВОЙСТВА НК-КЛЕТОК ОВЕРЭКСПРЕССИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДВОЙНОЙ МОДИФИКАЦИИ НК-КЛЕТОК СОВМЕСТНО С ТАРГЕТНЫМ ТРАНСГЕНОМ

М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко

ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: mstreltsova@mail.ru

Ключевые слова: геномодифицированные НК-клетки, иммунотерапия, hTERT, каталитическая субъединица теломеразы, продолжительность жизни, натуральная цитотоксичность, двойная трансдукция.

Получение большого числа высокофункциональных НК-клеток для использования в клинических целях требует их предварительной активации, направленной на повышение пролиферативного потенциала и цитотоксической активности. В данной работе были получены модифицированные геном каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) НК-клетки и показана функциональная активность вставленного гена. Доказано, что введение гена каталитической субъединицы теломеразы статистически повышает продолжительность жизни клеток, но не приводит к истинной иммортализации [1]. Изучена взаимосвязь эффективности ретровирусной трансдукции с наличием или отсутствием различных поверхностных маркеров НК-клеток. Были показаны различия в эффективности модификации субпопуляций, отличных по уровню экспрессии, KIR2DL2/3. NKG2C и HLA-DR [2]. Была отработана методика одновременной доставки двух трансгенов в НК-клетки. При этом показана функциональная активность трансгенов. Работа поддержана грантом РФФ № 22-75-00110.

Литература:

1. Streltsova M.A., Ustiuzhanina M.O., Barsov E.V. et al. Biomedicines. 2021. V. 9 (6): P. 662.
2. Palamarchuk A.I., Alekseeva N.A., Streltsova M.A. et al. Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 13326.

АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГИПОТЕНЗИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЕРВИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

А.М. Суббот, Н.В. Фисенко, Г.А. Осипян

ФГБНУ НИИ глазных болезней, Москва, Россия

e-mail: kletkagb@gmail.com

Ключевые слова: культура эндотелиальных клеток роговицы, цитотоксичность, бримонидин, дорзоламид, тимолол, бензалкония хлорид.

Эндотелий роговицы — монослой клеток, жизненный цикл которых *in vivo* остановлен в G1-фазе. Снижение плотности эндотелиальных клеток (ЭК) вызывает повышение проницаемости роговицы для внутриглазной жидкости (ВГЖ) и помутнение ее слоев. Как правило, это обусловлено наследственной патологией роговицы, повреждением ЭК при интраокулярных операциях, повышением внутриглазного давления (ВГД) и др. Для снижения ВГД применяют ряд лекарственных препаратов (ЛП). Часто в качестве консерванта в состав ЛП входит бензалкония хлорид (БХ). Цель: оценить цитотоксичность гипотензивных ЛП и БХ на ЭК роговицы человека. Материалы и методы. ЭК получали ферментативной диссоциацией десцеметовых мембран с эндотелием. Культивирование проводили на среде K-SFM при 37°C, 5% CO₂, и 100% влажности. Плотные колонии ЭК расценивали как модель монослоя — аналог интактного эндотелия *in vivo*. Для модели отдельных ЭК (аналог поврежденного эндотелия) клетки рассеивали в более низкой плотности. Экспозицию ЭК обеих моделей проводили в течение 24 ч. с ЛП бримонидина, дорзоламида, тимолола (с БХ в составе БХ и без него), а также с БХ. Изучали цитотоксичность ЛП в разведениях, соответствующих их максимальной концентрации (Стах) в ВГЖ (бримонидин — 1,2 мкг/мл, дорзоламид — 3 мкг/мл, тимолол — 3 мкг/мл) [1, 2, 3] и превышающих её в 10 и 100 раз. Влияние БХ изучали в концентрациях, равных его содержанию в изучаемых разведениях ЛП. Морфологические изменения монослоя и отдельных ЭК оценивали фазово-контрастной микроскопией. На модели отдельных ЭК также выполняли MTS-тест. Результаты. Выявлены патологические изменения отдельных ЭК — под действием дорзоламида (без БХ), монослоя и отдельных ЭК — под влиянием тимолола (без БХ) в концентрациях, превышающих их Стах во ВГЖ в 10, 100 раз. Дорзоламид и тимолол (оба с БХ) в концентрациях, превышающих Стах во ВГЖ в 10 раз, цитотоксичны для отдельных ЭК. Увеличение концентрации дорзоламида (с БХ) в 100 раз способствует умеренным изменениям монослоя и снижению выживаемости ЭК на 21,4% (p<0,05). Тимолол (с БХ) в концентрации, превышающей Стах в 100 раз, приводит к гибели монослоя и снижает выживаемость ЭК на 79% (p<0,05). Бримонидин (с БХ) в этом разведении, вызывает апоптоз ЭК монослоя и снижение выживаемости ЭК на 68,8% (p<0,05). Сходные изменения монослоя и отдельных ЭК возникают при экспозиции с БХ в концентрациях, равных его содержанию в изучаемых ЛП в этих разведениях.

Выводы. Антиглаукомные ЛП, содержащие БХ, могут в высоких концентрациях нарушать структуру и функциональные свойства ЭК. Применение данных ЛП нецелесообразно при низкой плотности ЭК роговицы и после кератопластики.

Литература:

1. Loftsson T., Jansook P., Stefánsson E. Acta Ophthalmol. 2012. V.9. № 7. P. 603–608.
2. Acheampong A.A., Shackleton M., John B. et al. Drug Metab Dispos. 2002. V.30. № 4. P.421–429.
3. Lee V.H., Luo A.M., Li S.Y. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991. V.32. № 11. P. 2948–2957.

ВЫЯВЛЕНИЕ ИНСУЛИНА И ГЛЮКАГОНА В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГИСТОГЕНЕЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ИГЛИСТЫХ МЫШЕЙ (АСОМУС)

К.Н. Султанова, И.С. Неофитов, А.А. Титова, Р.В. Урсан, А.С. Плюшкина, М.С. Калигин, А.П. Киясов

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: kasana555_07@mail.ru

Ключевые слова: инсулин, глюкагон, эмбриогенез, поджелудочная железа, мыши *Acomys*.

Мыши *Acomys* (иглистая мышь) — малоизученная удобная модель для изучения эмбриогенеза, так как у этих мышей более длительный период беременности 39–40 дней [1], 2–4 мышонка в помете, рождающиеся с высокой степенью морфофункциональной зрелости [2]. До сих пор нет единой точки зрения и доказательств какие из двух основных типов клеток островков Лангерганса, α - или β -клетки, появляются первыми в процессе эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы [3, 4]. Поэтому целью нашего исследования было изучение экспрессии инсулина и глюкагона в поджелудочной железе иглистых мышей в процессе пренатального развития.

Материалы и методы. Исследование было проведено на мышах *Acomys*, были изучены 15-е, 19-е, 22-е, 24-е, 28-е, 34-е, 38-е сутки (Е) гестации. До E28 исследовали цельные эмбрионы, на более поздних сутках проводили забор фетальной поджелудочной железы. Гистологические срезы окрашивали иммуногистохимически с использованием антител к инсулину (Novocastra) и глюкагону (Dako).

Результаты. Первые глюкагон-позитивные клетки были обнаружены на E19. На сроке E22 выявлены первые инсулин-позитивные клетки. Между E22 и E28 инсулин-позитивные клетки единичны, далее их количество резко увеличивается, и на сроке E34 выявляются инсулин-позитивные клетки преимущественно в центральной части островков Лангерганса. Количество глюкагон-позитивных клеток растет постепенно от E19 к E34.

Формирование кластеров, подобных островкам, начинается со срока E22. Островки Лангерганса становятся отчетливо различимы с E34, в которых инсулин-позитивные клетки занимают преимущественно центральную часть островка и располагаются группами, в виде ленты, или рассеяны по всему островку неорганизованным образом. Глюкагон-позитивные клетки на поздних сроках гестации находятся преимущественно на периферической части островка, и встречаются единичные клетки в паренхиме органа.

Выводы. Таким образом, у иглистых мышей в процессе пренатального развития α -клетки появляются раньше, чем β -клетки. Увеличение количества глюкагон-позитивных клеток идет постепенно, а инсулин-позитивных клеток — скачкообразно, основной момент кратного роста количества β -клеток происходит с E28 до E34. У иглистых мышей островковый эндокринный аппарат поджелудочной железы сформирован к моменту рождения. Работа выполнена в рамках Программы академического стратегического лидерства Казанского Федерального Университета (Приоритет-2030).

Литература:

1. Haughton C.L., Gawriluk T.R., Seifert A.W. J.Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2016. V. 55(1). P. 9.
2. Pinheiro G., Prata D.F., Araújo I.M. et al. Lab. Anim. 2018. V. 52(6). P. 565.
3. Jensen J., Heller R.S., Funder-Nielsen T. et al. Diabetes. 2000. V. 49(2). P. 163.
4. Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R. et al. Diabetes. 2013. V. 62(10). P. 3514.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ГЕРНИОПЛАСТИКИ

И.В. Супрун, Г.П. Чупрынин, А.А. Фоменко, Е.А. Солоп, А.С. Асякина, А.А. Вережкин, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова, К.И. Мелконян

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия

e-mail: supruniv@ksma.ru

Ключевые слова: герниопластика, ацеллюлярный дермальный матрикс, иммуногистохимия.

На долю герниопластики приходится 20% всех операций в абдоминальной хирургии. При этом в 26% случаев в позднем послеоперационном периоде развивается рецидив грыжи. Натяжная герниопластика, лишённая этого недостатка, не позволяет ушивать крупные грыжи ввиду опасности развития дыхательной недостаточности. Альтернативой может служить ненапряжная пластика с использованием синтетического материала. Однако их применение сопряжено с риском рецидива, появления парестезий или хронического болевого синдрома.

Это делает актуальным поиск замены существующим материалам для пластики грыж. Перспективной альтернативой представляется ацеллюлярный дермальный матрикс (АДМ), получаемый путём обесклевывания дермы свињи.

Целью исследования был морфологический анализ отдалённых результатов имплантации ацеллюлярного дермального матрикса для закрытия грыжевого дефекта в условиях экспериментальной модели.

Для моделирования вентральной грыжи у поросёнка породы Ландрас была рассечена белая линия живота. После заживания послеоперационной раны выполнили герниопластику с помощью АДМ, полученного путём обработки свиной дермы растворами Тритона X-100 и трипсина. Через 120 дней животное вывели из эксперимента. Ткани из области ушивания грыжи подвергли гистологическому исследованию. Помимо рутинной окраски гематоксилином-эозином, использовали трихром по Массону и иммуногистохимическую реакцию с антителами к CD31, CD68 и коллагену I типа.

В препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином и трихромом по Массону, выявили хорошо развитую плотную соединительную ткань с незначительным количеством кровеносных сосудов. При этом воспаление полностью отсутствовало, кроме того, не обнаружено соединительно-тканной капсулы на границе собственных тканей животного и имплантированного матрикса. АДМ характеризовался прорастанием умеренного количества тонкостенных капилляров с нормально сформированной эндотелиальной выстилкой, о чём свидетельствует высокий уровень экспрессии эндотелиоцитами молекул клеточной адгезии CD31. Клеточный компонент имплантированного матрикса также был хорошо выражен. При этом иммунофенотипирование выявило лишь единичные CD68-позитивные макрофаги.

Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования говорят о полной интеграции АДМ в собственные ткани животного, а также об отсутствии его иммуногенности. Таким образом он представляется перспективным материалом для герниопластики.

СРАВНЕНИЕ ФЕНОТИПА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ РОГОВИЦЫ И ФИБРОБЛАСТОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В КЕРАТОЦИТЫ

М.А. Суровцева¹, И.И. Ким¹, Н.А. Бондаренко¹, А.П. Лыков¹, К.Ю. Краснер^{1,2}, Е.В. Чепелева¹, А.Н. Трунов², В.В. Черных², О.В. Повещенко¹

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза им. С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

e-mail: mfelde@ngs.ru

Ключевые слова: фибробласты роговицы, кератоциты, дифференцировка, пролиферация, миграция, цитокины.

Ранее было показано, что роговица человека может быть источником стромальных клеток (hCSCs): кератоцитов и фибробластов. В последние годы значительно увеличилось количество пациентов, подвергающихся лазерной коррекции миопии и астигматизма методом ReLEx SMILE, при котором в толще роговицы формируется диск (лентикюла) и затем удаляется через малый разрез в роговице. Учитывая дефицит роговицы, особенно ее переднецентральной части, мы предлагаем использовать свежие лентикюлы в качестве источника hCSCs. Фибробласты роговицы обладают пластичностью и могут становиться покоящимися кератоцитами при культивировании в бессывороточной среде для роста кератоцитов (KGM), с добавлением аскорбиновой кислоты, ITS и bFGF.

Цель исследования: выделение hCSCs из нового источника — стромальных ReLEx SMILE лентикюл и проведение сравнительного анализа морфологии и функциональных свойств фибробластов и кератоцитов, дифференцированных в кератоциты. hCSCs выделяли ферментативным способом из лентикюл, полученных после коррекции зрения 30 пациентов с миопией методом ReLEx SMILE. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2мМ L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Дифференцировку

фибробластов роговицы в кератоциты проводили в селективной среде KGM. Фенотипы клеточных культур определяли методом проточной цитометрии. Проллиферацию и миграцию клеток оценивали с помощью анализатора клеток в реальном времени RTCA. Продукцию клетками ЭПО, BDNF, VEGF, TNF-альфа, IGF-1, SDF-1a, siCAM-1, виментина, фибронектина и общего коллагена определяли иммуноферментным анализом (ИФА).

hCSCs имели морфологию и фенотип фибробластов в ростовой среде с добавлением 10% ЭТС. Они экспрессировали маркеры мезенхимальных клеток CD73 (99,2 ± 1,62%), CD105 (22,8 ± 2,91%), но не несли CD90, CD34, CD45, HLA-DR, а также кератокан и люмикан. После дифференцировки фибробластов в кератоциты, клетки имели вытянутую, дендритоподобную форму, экспрессировали высокие уровни маркеров кератоцитов: кератокан (98,8 ± 1,93, %) и люмикан (81,4 ± 26,64, %), но не маркеры фибробластов. По данным анализатора клеток в реальном времени RTCA, фибробласты роговицы обладали более выраженной пролиферативной и миграционной активностью, по сравнению с кератоцитами. Кондиционная среда фибробластов содержала более высокие уровни VEGF и виментина. Фибробласты, дифференцированные в кератоциты продуцировали более высокие уровни EPO и BDNF. Уровень фибронектина, коллагена, SDF-1a, IGF-1, TNF-альфа и siCAM-1 был одинаковым в кондиционных средах фибробластов и кератоцитов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что лентикюлы, полученные с помощью ReLEx SMILE, могут быть источником фибробластов роговицы, которые затем могут быть дифференцированы в кератоциты для различных задач регенеративной медицины.

C-KIT-ПОЗИТИВНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ИНТИМЕ АОРТЫ С АНЕВРИЗМОЙ

Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева, М.А. Соборов, С.В. Гарманов, В.А. Мироненко, Р.А. Серов

ФГБУ НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: sukhachevat@gmail.com

Ключевые слова: аневризма аорты, интима, медиа, C-kit.

У пациентов с аневризмой аорты выявлено значительное ремоделирование всех ее слоев и, в первую очередь, интимы и медиа. Изменения в медиа аорты связаны с преобразованием фенотипа гладкомышечных клеток с сократительного на синтетический, изменением состава и структуры межклеточного вещества, что приводит к нарушению эластичности и прочности стенки сосуда. Изменения интимы исследованы менее подробно, в то время как регенераторный потенциал этого слоя является основой сохранения целостности стенки аорты.

Проанализированы интраоперационные биоптаты восходящего отдела аорты пациентов с диаметром аорты менее 55 мм (средн. 47,3 ± 5,7 мм) (группа Ao < 55, 18–76 лет, n=44) и 55 мм и более (средн. 61,6 ± 11,2 мм) (группа Ao ≥ 55, 29–84 г, n=29). Расширение диаметра аорты свыше 55 мм является фактором высокого риска для ее расслоения и показанием к протезированию. Гистологические срезы окрашены гематоксилином и эозином и по Вейгерту. На светооптическом уровне (×100) измерена толщина интимы и медиа аорты, выраженность морфологических изменений определена по 4-балльной шкале. Методами иммуногистохимии в стенке аорты выявлены клетки, иммунопозитивные к гладкомышечному

α -актину, С-kit, CD34, CD44. Результаты сопоставлены с данными клиники с использованием методов непараметрической статистики.

Толщина интимы*/медии аорты у пациентов группы Ао<55 составила $79,3 \pm 63,1$ мкм/1184,0 \pm 198,2 мкм, в группе Ао \geq 55 — $162,7 \pm 177,4$ мкм*/1144,3 \pm 288,4 мкм (*Манн-Уитни, $p < 0,05$). У пациентов группы Ао<55 по мере дилатации аорты толщина интимы и медии аорты нарастала ($r = 0,45$; $p = 0,002$; $r = 0,46$; $p = 0,002$). У пациентов группы Ао \geq 55 дилатация аорты коррелировала с истончением ее медии ($r = -0,45$; $p = 0,003$), выраженной фрагментацией эластических волокон ($r = 0,41$; $p = 0,004$) и кистовидной дегенерацией ($r = 0,44$; $p = 0,002$).

Утолщение интимы под воздействием гемодинамической нагрузки сопровождалось у 27% пациентов появлением в субэндотелиальном слое дилатированной аорты С-kit+ стволовых клеток округлой формы, диаметром 6,4 мкм. С-kit+ клетки встречались в интиме аорты с наиболее утолщенной медией ($r = 0,60$; $p = 0,04$), размеры которой превышали 1100 мкм. Кроме того, появление С-kit+ клеток в интиме коррелировало с ее ремоделированием и заселением миофибробласто-подобными клетками с CD34+ ($r = 0,33$; $p = 0,029$) и CD44+ ($r = 0,36$; $p = 0,028$) иммунофенотипом.

Таким образом, аневризма восходящей аорты сопровождается компенсаторным утолщением интимы/медии, которое коррелирует с активизацией регенераторного потенциала интимы, появлением в ней С-kit+ клеток и изменением её клеточного состава.

ТЕЛОЦИТЫ И ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ МИОМЕТРИЯ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Т.В. Сухачева¹, Р.А. Серов¹,
М.Н. Шамаракова², Н.В. Низяева³

¹ ФГБУ НМИЦ ССХ им АН Бакулева МЗ РФ, Москва, Россия

² Центр Планирования семьи и Репродукции (ЦПСИР), Москва, Россия

³ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: sukhachevat@gmail.com

Ключевые слова: телоциты, миометрий, макрофаги, преэклампсия, фибробласты.

В работе выявлены особенности ультраструктуры фибробластоподобных клеток (ФБК) миометрии и телоцитов (Тц) при преэклампсии (ПЭ) и при неосложненной беременности.

Исследованы образцы миометрии 22 женщин 18–43 лет на сроке 27–39 недель гестации. У 12 пациенток диагностировали ПЭ, группа контроля — 10 женщин с неосложненной доношенной беременностью. Образцы миометрии получены во время кесарева сечения (вне области плацентарной площадки), препараты изучены под электронным микроскопом. Достоверность различий оценивали по U-критерию Манна–Уитни при $p < 0,05$.

У пациенток обеих групп в интерстиции миометрии между пучками гладкомышечных клеток и вокруг маточных сосудов обнаружены ФБК веретеновидной или звездчатой формы, с длинными отростками. Некоторые из этих клеток соответствовали морфологическим критериям Тц [1]. При ПЭ отростки ФБК были толще, чем в контроле и составили $0,37 \pm 0,2$ мкм и $0,19 \pm 0,6$ мкм, соответственно; диаметр клеток был больше ($3,2 \pm 1,2$ мкм vs $2,7 \pm 1,1$ мкм), а диаметр ядер не отличался

($1,8 \pm 0,9$ мкм и $1,8 \pm 0,8$ мкм) в группах ПЭ и контроля. В околоядерной зоне цитоплазмы и в отростках Тц выявлены цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, что свидетельствовало об их высокой синтетической активности. В некоторых ФБК обнаружены ультраструктурные признаки гладкомышечной и макрофагальной дифференцировки — фрагменты базальной мембраны, сократительные фибриллы с электронно-плотными тельцами вблизи плазмолеммы, вакуоли, липидные включения, мелкие фагосомы. Подобные ФБК с длинными отростками, по-видимому, представляли собой популяцию клеток промежуточной миофибробластической дифференцировки, нередко имели общие черты с макрофагами. При ПЭ Тц почти отсутствовали, и переходных форм ФБК было значительно больше ($p < 0,05$). Феномен ремоделирования мезенхимальных клеток с приобретением морфологических признаков фибробластов и макрофагов был ранее описан нами в плаценте [2] и в миокарде [3]. Изменение морфологии мезенхимальных клеток показывает, что при ПЭ меняются характеристики миометрии. Финансирование: Работа выполнена в рамках ЕГИСУ НИОКТР — 122030200534-4

Литература:

1. Cretoiu S.M., Popescu L.M. *Biomol Concepts*. 2014. V.5. P. 353.
2. Nizyaeva N.V., Sukhacheva T.V., Serov R.A. et al. *Sci Rep*. 2018. V. 8. P. 3453.
3. Sukhacheva T.V., Serov R.A., Nizyaeva N.V. et al. *Cells*. 2022 V.11. P.175.

ОЦЕНКА ПРОАНГИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, КО-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ FGF2 И VEGF165, НА ИНДУКЦИЮ ЛОКАЛЬНОГО АНГИОГЕНЕЗА IN VIVO

В.Ю. Сыромятникова¹, И.И. Салафутдинов¹,
М.О. Гомзикова¹

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: Lera_181990@mail.ru

Ключевые слова: незаживающие раны, регенерация кожи, ангиогенез, фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов, плазмидная ДНК.

Ежегодно миллионы людей страдают от незаживающих ран и патологических рубцов, что требует создания новых эффективных подходов к лечению повреждений кожи. Исследования показывают, что около 15 % ран остаются не вылеченными через год после обращения [1], при этом предполагается, что от 1 до 2% населения развитых стран будут иметь хронические раны в течение жизни [2]. Особое значение для успешной регенерации кожи играют проангиогенные факторы роста — фактор роста фибробластов (FGF2) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), которые участвуют в образовании новой сосудистой сети, необходимой для доставки питательных веществ, кислорода и иммунных клеток. Цель данного исследования — оценка проангиогенного потенциала плазмидной ДНК pBud-VEGF165-FGF2, ко-экспрессирующей одновременно и независимо гены fgf2 и vegf165, на индукцию локального ангиогенеза in vivo. Нами было подкожно, в составе матригеля трансплантировано 2×10^6 НЕК293Т, трансфицированных pBud-VEGF165-FGF2, крысам линии Wistar ($n=4$). Контрольной группе животных ($n=4$) ввели аналогичное

количество нетрасфицированных клеток в матригеле. Через семь дней область введения имплантов аккуратно иссекали и использовали для гистологического анализа. Дermalный слой кожи в месте имплантации трансфицированных pBud-VEGF165-FGF2 клеток был богато васкуляризован большим количеством обильно кровоснабжаемых разветвленных сосудов различного диаметра. Фрагменты изолированного матригеля с трансфицированными клетками также значительно отличались по уровню васкуляризации по сравнению с контролем, а именно количеством, размером и длиной проросших сосудов, в которых наблюдались внутрисосудистые эритроциты, что свидетельствуют о наличии в них кровотока. Кроме того, во всех исследованных образцах не была обнаружена инфильтрация воспалительных клеток. Таким образом, подкожная имплантация HEK293T, трансфицированных плазмидной ДНК pBud-VEGF165-FGF2, ко-экспрессирующей гены *fgf2* и *vegf165*, способствует индукции локального ангиогенеза *in vivo*. Работа была выполнена при финансовой поддержке исследовательского проекта РНФ № 21-75-10035 и в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Литература:

1. Jørgensen S.F. et al. Journal of wound care. 2013. V. 22. № 10. P. 540–545.
2. Gotttrup F.A. et al. The American journal of surgery. 2004. V. 187. № 5. P. S38-S43.

КАЛЬЦИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Е.В. Сытина¹, Т.Х. Тенчурин¹, Е.В. Соловьева¹, А.А. Алексеев², С.Н. Чвалун¹, А.А. Пантелеев¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ Центр хирургии им. А.В. Вишневского, Москва, Россия

e-mail: esytina@mail.ru

Ключевые слова: биоинженерия, нетканый материал, коллаген, подкожная имплантация, кальцификация.

В тканевой инженерии природные полимеры обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими, обеспечивая для клеток среду, приближенную к естественной. Ранее нами была разработана методика получения нетканых материалов на основе коллагена. Материалы, полученные из растворов коллагена в уксусной кислоте, подвергали термической обработке для достижения различной степени денатурации в ряду коллаген-желатин и стабилизировали генипином. Коллагеновые и желатиновые матрицы имплантировали под кожу мышам линии BalbC на разные сроки. На 35й день после имплантации отек и спаянность с подлежащими тканями отсутствовали. Гистологическое исследование выявило, что клетки проникали внутрь обоих образцов только с торцов или в местах нарушения их целостности. Растущие капилляры наблюдались лишь в областях, где соединительная ткань образовалась между складками образца. Инфильтрация моноцитами наблюдалась по периметру всех образцов, при этом в желатиновых образцах наблюдались признаки хронического продуктивного воспаления (формирование единичных гранул, гигантских клеток инородных тел и тонкой капсулы). Коллагеновые образцы резорбировались

медленнее, гранулемы и гигантские клетки не обнаружены. Таким образом, желатиновые нетканые материалы деградировали быстрее коллагеновых и вызывали более выраженную реакцию организма.

Оба типа материалов, сшитых генипином, длительно сохранялись в тканях. Через 3 месяца они были хорошо различимы на гистологических препаратах, признаки воспаления на макроскопическом уровне отсутствовали. Окрашивание ализариновым красным выявило кальцификацию только коллагенового материала. Через полгода гистологическая картина осталась без изменений: интенсивная кальцификация коллагенового материала и её отсутствие в желатиновом. Коллагеновые образцы стали жесткими, а желатиновые сохранили мягкость, подверглись лишь частичной резорбции и сохранили структуру. Они не проросли сосудами, оставаясь непроницаемыми для клеток. Кальцификация — серьезное препятствие для использования искусственных материалов при реконструкции мягких тканей, хотя может быть плюсом в тканевой инженерии кости. Желатин может быть перспективным для создания нетканых материалов, ограничивающих проникновение клеточных элементов внутрь импланта. Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

АНАЛИЗ ПОДВИЖНОСТИ MNHP70-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИБЛАСТОМЫ В МОДЕЛИ ЭКСПЛАНТАТА

Р.Б. Тагаева^{1,2}, Н.М. Юдинцева^{1,2}, Д.Е. Бобков^{1,2}, Д.Ф. Гончарова², А.С. Нечаева², Е.В. Федоров², М.А. Шевцов^{1,2}

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Центр персонализированной медицины, НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: tagaeva97@yandex.ru

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, эксплантат, инвазия, мембранно-связанный белок теплового шока mHsp70.

Мультиформная глиобластома (МГБ) является наиболее распространенной злокачественной опухолью головного мозга со средней выживаемостью пациентов около 15 месяцев [1]. Сложность в исследовании МГБ связана с ее высокой гетерогенностью и повышенной инвазивностью [2]. Поскольку способность клеток МГБ проникать в здоровую ткань головного мозга определяется сложным взаимодействием между опухолевыми клетками и их микроокружением [3], для изучения организации опухоли и анализа опухолевого роста используют 3D-модель миграции клеток из эксплантата (фрагмента опухоли, полученного в ходе проведения хирургической операции) [4].

В настоящем исследовании анализ подвижности клеток МГБ, мигрировавших из эксплантата, проводили с помощью системы прижизненной микроскопии CQ1 (Yokogawa, Япония) в течение 24 часов с интервалом съемки 15 минут, используя такие параметры, как средняя скорость и извилистость трека. Клетки предварительно окрашивали антителами к мембранно-связанной форме белка теплового шока mHsp70 (Thermo Fisher, США), который избирательно экспрессируется на поверхности опухолевых, но не нормальных клеток [5].

Мигрировавшие из эксплантата клетки, на основе морфологических параметров и экспрессии mHsp70, разделили на две субпопуляции — фибробластоподобные mHsp70-отрицательные (mHsp70⁻) и опухолевые mHsp70-положительные клетки (mHsp70⁺).

Результаты анализа подвижности показали, что средняя скорость движения mHsp70⁺ клеток существенно выше, чем mHsp70⁻ клеток. Более того, при подавлении mHsp70 низкомолекулярными ингибиторами скорость движения mHsp70⁺ клеток снижалась, что может свидетельствовать о возможном участии белка в инвазии и миграции опухолевых клеток. mHsp70⁺ клетки также обладали более извилистыми треками движения, что может указывать на их высокий инвазивный потенциал. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Литература:

1. Vollmann-Zwerenz A., Leidgens V., Feliciello G. et al. *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21. № 6. P. 1932.
2. Lathia J.D., Heddeleston J.M., Venere M. et al. *Cell Stem Cell.* 2011. V. 8. № 5. P. 482.
3. Charles N.A., Holland E.C., Gilbertson R. et al. *Glia.* 2012. V. 60. № 3. P. 502.
4. Soubéran A., Tchoghandjian A. *Cancers.* 2020. V. 12. № 9. P. 2347.
5. Shin B.K., Wang H., Yim A.M. et al. *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 7607.

АУТОЛОГИЧНЫЙ ОБОГАЩЕННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТ ДЛЯ ПРЕВЕНТИВНОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В МОДЕЛИ НА МИНИ-СВИНЬЯХ

С.С. Таргачев, Д.А. Трофимов, Г.Г. Кундакчян, А.М. Агаев, Л.А. Новичёнков, Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, В.А. Маркосян, З.З. Сафиуллов

ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия

e-mail: vage.markosyan@gmail.com

Ключевые слова: лейкоконцентрат, превентивная генная терапия, ишемический инсульт, животные модели.

В предыдущих работах нами был разработан эффективный способ лечения травматического повреждения спинного мозга у мини-свиней с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащённого генами, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM).

В настоящем исследовании мы использовали данный препарат с целью генной терапии ишемического инсульта. Эксперименты выполнены на взрослых самках мини-свиньях (n=6), которым моделировали ишемический инсульт головного мозга путем окклюзии средней мозговой артерии с последующей перевязкой сонной артерии на противоположной стороне. Опытным животным (n=3) за 2 суток до операции внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами vegf165, gdnf и psam1. Контрольным мини-свиньям (n=3) свиньям вводили физиологический раствор. В течение 21 сутки после моделирования инсульта у подопытных животных

оценивали двигательную активность с помощью поведенческого теста «Открыто поле». Мини-свиней помещали в арену (3×3м), разделенную линиями на 6 одинаковых квадратов, и в течение 10 минут подсчитывали количество пересеченных линий.

Через три недели эксперимента животных наркотизировали, забирали головной мозг и оценивали объем инфаркта мозга. Для измерения абсолютного объема инфаркта (АОИ) получали цифровые изображения фронтальных срезов головного мозга толщиной 3 мм, которые фотографировали с обеих сторон. Относительный объем инфаркта (ООИ) высчитывали по формуле: АОИ/АОИ+объем головного мозга. Выживаемость клеток в перинфарктной области изучали иммунофлуоресцентным методом помощью антител к проапоптотическому белку (Caspase3) и белку теплового шока 70 кДа (Hsp70). На 3-й день после моделирования инсульта показано снижение двигательной активности в обеих группах животных с последующим восстановлением на 7-й и 14-й дни. На 21-й день наибольшее улучшение показателей было выявлено в терапевтической группе. Макроскопический анализ мозга через 21 день после моделирования инсульта выявил очаговый ишемический инфаркт, локализованный в височной доле левого полушария.

Анализ объемов инфаркта мозга подопытных животных обнаружил, что у мини-свиней из опытной группы объем инфаркта был в два раза меньше, чем контрольной группе. При этом, иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что количество клеток, вступивших в апоптоз, было больше в контрольной группе, чем в опытной, однако Hsp70-иммунопозитивная область не отличалась между группами.

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии превентивной внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, несущего гены vegf165, gdnf и psam1, на восстановление двигательной активности и сохранности ткани мозга после моделирования ишемического инсульта.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Т.Х. Тенчурин², Д.М. Седов^{1,2}, Р.В. Шариков², Л.И. Давыдова², К.В. Сидорук², Е.В. Соловьева², В.Г. Богуш², Т.Е. Григорьев²

¹ РТУ МИРЭА, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия

e-mail: tenchurin.timur@mail.ru

Ключевые слова: поли-(L-лактид-со-ε-капролактона), дицетата целлюлозы, рекомбинантный спидроин, электроформование, раневые повязки.

Травмы, получаемые в результате аварий, падений, ожогов или военных действий, ежегодно приводят к смерти более 5 миллионов человек во всем мире. Особое место в снижении производительности труда и повышении расходов на медицинское обслуживание занимают ожоговые травмы. Несмотря на широкий ассортимент перевязочных средств, представленных на парафармацевтическом рынке, нет покрытия, в полной мере удовлетворяющего требованиям полифункционального, недорогого и эффективного изделия. В этой связи в настоящей работе разработан двухслойный волоконный материал на основе дицетата целлюлозы (ДАЦ)

и поли-(L-лактид-со-ε-капролактона) (ПЛК) в соотношении 70:30. В нем в качестве модели базальной мембраны использован нетканый материал из ПЛК, предназначенный для формирования слоя эпителиальных кератиноцитов и предотвращения взаимопроникновения клеток эпителия и дермы при регенерации кожного покрова. Второй слой представлял собой 3D каркас из ДАЦ, предназначенный для формирования дермы, заселяемой фибробластами. Оба слоя были изготовлены методом электроформования и затем модифицированы рекомбинантными спидроинами (РС) и/или модифицированными мономерами РС (ММ) с гепарин связывающим пептидом (НВР) и с тетрапептидом RGDS для повышения биосовместимости и способности к васкуляризации и формированию грануляционной ткани при подкожном имплантировании мышам. Для придания антибактериальной активности в состав каждого волокнистого материала вводился антибиотик — гентамицин. Полученные результаты показали, что введение РС в комбинации с ММ с НВР и ММ с RGDS вызывает значительное усиление адгезивных свойств и способности к васкуляризации и формированию грануляционной ткани у нетканых матриксов на основе синтетических материалов, что существенно повышает перспективы использования РС и их комбинаций с биологически активными пептидами для регенеративной медицины. Волокнистый материал на основе ПЛК продемонстрировал антибактериальную активность по отношению к штамму *E. coli* MC1061. Работа выполнена в рамках внутреннего гранта НИЦ «Курчатовский институт» № 2755 и государственного задания НИЦ «Курчатовский Институт».

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОММЕРЧЕСКИХ МЕМБРАН ДЛЯ СТОМАТОЛОГИИ

Т.Х. Тенчурин², И.Я. Бозо¹, С.В. Крашенинников²

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия

e-mail: tenchurin.timur@mail.ru

Ключевые слова: коллагеновые мембраны, стоматология, механические свойства.

Коллагеновые мембраны широко используются в медицине для костной пластики, закрытия дефектов сосудов и сердца и т.п. вследствие высокой биосовместимости, разнообразия механических свойств, контролируемой кинетики биодеградации, способности коллагена связываться с различными биологически активными соединениями и стимулировать процесс регенерации тканей. В хирургической стоматологии коллагеновые мембраны используются в качестве барьера, временно разделяющего зону регенерации костной ткани от окружающих кость мягких тканей, для удержания имплантированных остеопластических материалов в зоне репаративного остеогенеза, а также для оптимизации регенерации мягких тканей. Одним из лидеров среди коллагеновых материалов, применяющихся в хирургической стоматологии, является мембрана Bio-Gide® (Geistlich, Швейцария). В свете усиления тренда к импортозамещению мы провели сравнение механических свойств мембраны Bio-Gide® с коллагеновой мембраной CONTUR® отечественного производства (биомедицинская компания «Cardioplant», г. Пенза), а также резорбируемой коллагеновой мембраной Ortokeep® (Ортософт, Россия).

Анализ среднего размера пор показали, что все исследованные матриксы представляют собой пористые пленки, со средним размером пор: Bio-Gide® (два слоя) 4,4 и 0,3 мкм, CONTUR® 0,84 мкм, Ortokeep® 2,1 мкм. Размер пор в отечественных изделиях препятствует проникновению клеток в структуру материала, что подтверждает наличие барьерной функции. Пористость всех исследованных материалов сопоставима: 72–79%.

Сравнение механических характеристик Bio-Gide®, CONTUR® и Ortokeep® показало, что образцы отечественные изделия имеют заметно более высокую прочность и модуль упругости по сравнению с Bio-Gide®; для CONTUR® характерна также высокая деформация разрушения. Формы начальных участков кривых Bio-Gide® и CONTUR® схожи (характерные для большинства «биологических мягких тканей»), т.е. они хорошо растягиваются при относительно невысоких нагрузках, сохраняя при этом значительный запас прочности. Учитывая высокую деформацию разрушения CONTUR®, при сопоставимых удлинениях на 40–60% напряжения, возникающие в них, будут ниже, чем в материале Bio-Gide®. Это можно рассматривать как преимущество CONTUR®. Деформационные кривые Ortokeep® имеют вид, типичный для пластифицированных термопластов. То есть на них имеется ярко выраженный начальный участок (упругая область), который в данном случае не превышает 8% по деформации, затем этот участок переходит в область, в которой деформация уже не обратима. На практике это означает, что если растянуть мембрану более чем на 10% и оставить под нагрузкой, то в ней появятся слабые места и они, вероятно, быстро разрушатся.

По результатам проведенных сравнительных исследований можно сделать вывод, что материал CONTUR® более приближен к характеристикам Bio-Gide®, превосходит его по прочности, но имеет избыточную жесткость. Исследования выполнены при финансовой поддержке Госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ И ФАЗОВЫХ ТРАНСФОРМАЦИЙ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В МОДЕЛЯХ ИМПЛАНТАЦИИ SPF-ЖИВОТНЫМ С НОРМАЛЬНЫМ И ИЗМЕНЕННЫМ ИММУННЫМ СТАТУСОМ IN VIVO

А.Ю. Тетерина¹, И.В. Смирнов¹, П.В. Смирнова¹, И.С. Фадеева^{1,2}, В.В. Минайчев^{1,2}, С.М. Баринов¹, В.С. Комлев¹

¹ ФГБУ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

² ФГБУ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: teteterina_imet@mail.ru

Ключевые слова: биосовместимые материалы, кальций-фосфатные соединения, гидроксиапатит, октакальциевый фосфат, регенерация костной ткани, биоминерализация, биоинженерия.

Одним из наиболее интенсивно развивающихся подходов для регенерации поврежденной костной ткани является использование низкотемпературных фосфатов кальция, максимально соответствующих естественным кальцийфосфатным соединениям (КФС) нативной костной ткани, в частности, апатитоподобному фосфату кальция (ГАп) и его прекурсорам. Данная работа

направлена на выявление значимой для современной клинической медицины проблемы, заключающейся в выраженной вариабельности биологических эффектов, наблюдаемых при имплантации аналогичных КФС-материалов — от эффективной аугментации костной ткани до полного отторжения импланта, сопровождающегося разрушением собственной костной ткани.

С использованием подхода низкотемпературной химической трансформации получены КФС различного фазового состава и морфологии поверхности и проведены комплексные *in vitro* и *in vivo* исследования потенциала интегративного, индуцирующего, регенеративного, иммуногенного и провоспалительного потенциала соединений, являющихся участниками цикла естественной биоминерализации костной ткани. Установлено, что ДКФД, ОКФ и ГАп дозозависимо модулируют жизнеспособность, пролиферативную активность, адгезию и миграцию остеобластных клеток в условиях *in vitro*, а также ингибируют провоспалительную активацию миелоидных клеток врожденного иммунитета (макрофагов), но не влияют на активацию клеток адаптивного иммунитета (Т- и В-лимфоцитов). При этом, в условиях *in vivo*, на модели адьювант-индуцированного хронического латентного асептического воспаления у крыс моделированным хроническим воспалением) выявлено достоверное повышение общего количества лейкоцитов (в 1,8–2 раза, $p < 0,05$) и моноцитов (увеличение в 2,5–2,7 раза, $p < 0,05$) при имплантации ОКФ и ГАп, но не ДКФД. При имплантации тех же материалов животным с нормальным иммунным статусом каких-либо достоверных изменений в показателях крови не выявлено. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 21-73-20251 «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани»).

Литература:

1. Yamada S., Tokumoto M., Tatsumoto N, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2014;306(12): F1418–28.
2. Beghdadi W., Madjene L.C., Benhamou M. et al. Front Immunol. 2011; 2: 37.

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА И МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

А.В. Тимофеева, Э.Р. Ахметзянова

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

e-mail: anua_tima@mail.ru

Ключевые слова: микроглия, фенотип, травма спинного мозга крысы.

В последнее десятилетие идет активное изучение поведения клеток микроглии при различных поражениях центральной нервной системы, в том числе исследования поляризации данных клеток при травме спинного мозга (ТСМ). Считается, что полученные результаты могут открыть широкие перспективы для терапии пациентов не только с повреждением спинного мозга, но и другими неврологическими заболеваниями, в патогенезе которых активную роль играют клетки микроглии. В нашей работе мы провели количественную оценку различных популяций клеток микроглии нейротоксического (M1)

и нейропротективного (M2a) фенотипа в хронический период (60 сутки) ТСМ различной степени тяжести как в области приближенной к эпицентру повреждения (Th9), так и на удалении от него (L2-L3).

Крысам породы Wistar наносили контузионную ТСМ легкой (1,5 м/с), средней (2,5 м/с) и тяжелой (4 м/с) степени тяжести при помощи импактора на уровне Th8. Количественную оценку клеток микроглии на фоне ТСМ проводили путем иммуногистохимического анализа с использованием антител к Iba1+/CD40+(M1 фенотип) и Iba1+/TGF-β+(M2a фенотип) в зонах передних канатиков (VF), передних рогов (VH) и кортикоспинального тракта (CST). Количество Iba1+-клеток на 60 сутки после повреждения различной тяжести было достоверно выше в области Th9 с максимальным значением в зоне CST при сравнении с удаленными от эпицентра ТСМ участками L2-L3. При оценке Iba1+/CD40+-клеток было обнаружено, что в зоне CST их количество выше при травме 2,5 и 4 м/с в области Th9, данный показатель снижается на удалении к L2-L3, но остается достоверно выше при сравнении с интактным контролем. Количество Iba1+/TGF-β+-клеток не претерпело значимых изменений на фоне ТСМ различной степени тяжести на уровне Th9. Однако на удалении от места травмы (L2-L3) было обнаружено достоверное увеличение количества Iba1+/TGF-β+-клеток в области CST и VH в группе 1,5 м/с при сравнении с интактным контролем и группой с тяжелой степенью ТСМ (4 м/с). Также стоит отметить, что в области CST и задних канатиков было отмечено скопление клеток микроглии кольцевидной формы (annular-shaped microglia) [1] в области приближенной к эпицентру травмы Th9, а также на значительном расстоянии от него (C6-C7). При этом клетки микроглии с указанной морфологией отсутствовали в области каудальнее от повреждения L2-L3.

Таким образом, после ТСМ различной степени тяжести наибольшие изменения в распределении M1 фенотипа микроглии были обнаружены в месте приближенном к эпицентру травмы, а именно на уровне Th9, в то время как в отдаленной области (L2-L3) отмечены изменения в популяции как M1, так и M2a. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского Федерального Университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90060.

Литература:

1. Akhmetzyanova E.R. et al. Frontiers in molecular neuroscience. — 2021. — Т. 14.

ВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ ЗОНЫ ЗАЖИВЛЕНИЯ СТЕНКИ МАТКИ КРЫСЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Н.Б. Тихонова¹, А.А. Темнов^{2,3}, В.В. Алексанкина¹, А.П. Милованов¹, Т.В. Фокина¹, А.Н. Склифас³

¹ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

² МФТИ, Москва, Россия

³ ИБК РАН, Пущино, Россия

e-mail: reprod_pathol@morfolhum.ru

Ключевые слова: заживление, матка крысы, кондиционированная среда культивирования, мезенхимальные клетки, васкуляризация.

Механизм формирования несостоятельных рубцов стенки матки после кесарева сечения и разработка методов, предотвращающих возникновение патологического рубцевания, — важные задачи современного акушерства.

Целью нашего исследования стало изучение влияния компонентов кондиционированной среды культивирования аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга на васкуляризацию зоны заживления после сквозного хирургического разреза маточной стенки крысы.

Материалы и методы. Исследование проведено на половозрелых самках крыс линии Sprague Dawley (N=20, 220±30 г, возраст 3–4 месяца). Всем животным был выполнен сквозной продольный разрез правого рога матки с антимезометриальной стороны длиной 1 см. Половине животным в место разреза вносили препарат, полученный на основе кондиционированной среды культивирования аутологичных мезенхимальных клеток при культивировании в гипоксических условиях (10% O₂). Разрез ушивали хирургической нитью Викрил ups 6. Материал для гистологического исследования брали через 5 и 15 суток. Гистологические срезы окрашивали по Маллори, а также проводили иммуногистохимическое окрашивание с помощью мышинных моноклональных антител к альфа гладкомышечному актину и к CD31. На гистологических препаратах проводили измерение площади между разрезанными слоями миометрия, а также подсчитывали площадь сосудов в зоне заживления. Обработку результатов выполняли в программе Statistica 12 (StatSoft). Сравнение групп проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты. К 5-м суткам произошло полное смыкание маточной стенки. Площадь между разобщенными мышечными слоями у группы, получившей препарат, была достоверно меньше по сравнению с контрольной группой на 5-е (p<0,05) и на 15-е сутки (p<0,05). В контрольной группе площадь заживления с 5-х по 15-е сутки увеличилась (p<0,05). В опытной группе увеличение было недостоверным (p<0,05). Площадь сосудов в зоне заживления у животных опытной группы была достоверно ниже по сравнению с контрольными животными и на 5-е (p<0,05) и на 15-е сутки (p<0,05).

Заключение. Компоненты среды культивирования, полученной путем культивирования аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга при пониженном содержании O₂ (10%), существенно влияют на размер и васкуляризацию зоны заживления стенки матки после сквозного хирургического разреза, уменьшают интенсивность васкуляризации и способствуют уменьшению площади зоны.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПОСОБ «ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ» ЛИМФОЦИТОВ

Н.В. Тишевская¹, Н.М. Геворкян²

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

² ФГБНУ НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

Ключевые слова: перепрограммирование, лимфоциты, РНК, регенерация.

В отличие от способов перепрограммирования клеток *in vitro* в обход иммунологической несовместимости, здесь описан способ естественного «перепрограммирования» лимфоидных клеток *in vivo*. Каждый клон морфогенетически компетентных Т-лимфоцитов (Т-лфц)

является прообразом соматических клеток определенного гистотипа, их подвижным прототипом в гуморальной среде, и осуществляет клональную регуляцию роста клеток собственных тканей организма. Это подтверждается воспроизводимой при адоптивном переносе лимфоцитов органо- и тканеспецифичностью проявления их морфогенетической активности и интактных реципиентов, способностью Т-лфц синтезировать и секретировать многие биологически активные вещества, включая гормоны и факторы роста, и сходной с их тканью-мишенью реактивностью [1]. Особо выраженная и более ранняя реакция Т-лфц на внешние воздействия объясняет патогенетическую и терапевтическую роль этих клеток в развитии или коррекции нарушенных функций организма. То есть поражение органа и нарушение функций соответствующих клонов лимфоцитов — явления взаимосвязанные, причем дисфункция лимфоцитов, в силу указанных причин, первична.

Выраженным морфогенетическим эффектом обладает и выделенная из лимфоидных клеток суммарная РНК (сРНКлк) [2, 3], которая не имеет аллогенных и ксеногенных ограничений. Введение сРНКлк селезенки крыс с аллоксановым диабетом (АД) вызывает гипергликемию у интактных крыс [4], что свидетельствует о «перепрограммировании» донорских лимфоцитов, также чувствительных к токсическому действию аллоксана. Стойкая нормогликемия у крыс с АД достигалась введением сРНКлк здоровых особей. сРНКлк селезенки крыс с нормализовавшимся после АД уровнем глюкозы крови не вызывала у интактных животных гипергликемии [5], что свидетельствует о естественном «перепрограммировании» лимфоцитов крыс, перенесших АД. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований в РФ на долгосрочный период (2021–2030 годы).

Литература:

1. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 2. С. 189–202.
2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. № 1(13). С. 33–37.
3. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. № 11. С. 1280–1301.
4. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020. Т. 64. № 2. С. 85–88.
5. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020. Т. 64. № 4. С. 37–46.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ИЗ ВЫСОКОРЕГЕНЕРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛУБОКИХ РАН

Д.В. Товпеко, А.А. Кондратенко, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: tovpeko.dmitry@gmail.com

Ключевые слова: Вартонов студень пуповины человека, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, заживление ран, раневое покрытие, регенеративная медицина.

Лечение ран различной этиологии остается актуальной проблемой для военной медицины и гражданского здравоохранения. Сохраняется постоянный интерес к поиску биосовместимых материалов и разработке на их основе раневых покрытий, способствующих более эффективному

лечению и регенерации ран. Особого внимания заслуживают бесклеточные матриксы (ЕСМ), получаемые из различных тканей человека и животных путем децеллюляризации. Каждый тип ткани имеет свой уникальный состав ЕСМ, представленный гликопротеинами, протеогликанами и гликозаминогликанами, важными для пролиферации и синтетической активности соединительнотканых клеток, модулирующими ангиогенез и способствующими заживлению ран. Вартонов студень пуповины человека (WJ) представляет собой твердую слизистую соединительную ткань внеэмбрионального происхождения. Фенотип тканей пуповины аналогичен эмбриональным тканям, у которых выявлена способность к безрубцовому заживлению ран. Это делает пуповину человека особенно привлекательным биоматериалом для регенеративной медицины [1].

В настоящем исследовании децеллюляризацию WJ проводили детергентным способом с использованием 0,05% раствора додецилсульфата натрия (SDS) по ранее описанному протоколу [2]. Эффективность удаления клеток и нуклеиновых фрагментов оценивали с помощью гистологического окрашивания флуоресцентным красителем 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и количественного определения ДНК. Сохранность структурного состава подтверждали с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR).

Гистологические исследования выявили отсутствие ядер клеток в децеллюляризованном WJ (dWJ). Среднее содержание ДНК в WJ составило 468,75 (453,65–475,15) нг/мкл, в dWJ — 29,2 (27,8–30,7) нг/мкл ($p < 0,001$).

FTIR-спектры dWJ показали отсутствие фосфолипидного плеча, свидетельствующее о качестве децеллюляризации и, вместе с минимальным содержанием ДНК, — о потенциальной неиммуногенности изготовленного продукта. FTIR-спектры WJ и dWJ продемонстрировали аналогичные характеристические полосы поглощения, соответствующие функциональным группам коллагенов, протеогликанов и гликозаминогликанов.

Таким образом, изготовленный из высокорегенеративного биоматериала гомологичного происхождения бесклеточный продукт является потенциально неиммуногенным, сохраняет основные структурные и функциональные компоненты, присущие нативной пуповине и важные для процессов регенерации глубоких повреждений кожи.

Литература:

1. Kočí Z., Výborný K., Dubišová J. et al. Tissue Eng. Part C Methods. 2017. V. 23, № 6. P. / 333.
2. Калюжная Л.И., Чернов В.Е., Фрумкина А.С. и др. Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2020. Т. 22. № 1. С. 124.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

Л.Н. Токтохоева¹, Е.С. Дёмина¹, Н.П. Рабданова¹, Р.Ю. Абашеев¹, А.С. Долодоев^{1,2}, А.П. Цыбденова^{1,2}, Ю.С. Балханов², А.А. Нимаева³, М.Ф. Серых³

¹ Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

² ООО «МИП «Байкальский центр биотехнологий»

³ ООО «Шэнэскин», Улан-Удэ, Россия

e-mail: lyubov2316@mail.ru

Ключевые слова: ксеногенная сыворотка, лизат тромбоцитов, мезенхимальные стволовые клетки пупочного канатика.

Применение лизата тромбоцитов в связи с поиском оптимального состава сред для культивирования клеток, не содержащих ксеногенных компонентов и предназначенных для клинических и лабораторных протоколов, представляется актуальным [1]. Целью работы являлось определение влияния лизата тромбоцитов на морфофизиологические особенности стволовых клеток пупочного канатика человека *in vitro*.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным способом с помощью коллагеназы I типа и эксплантами. Ведение мезенхимальных стволовых клеток проводили в среде DMEM/F12 с эмбриональной телячьей сывороткой и лизатами тромбоцитов человека. Криодеструкцию тромбоцитов из пулированных лейкоредуцированных концентратов осуществляли при -2000 не менее 48 часов. Размороженные и ресуспендированные образцы лизата тромбоцитов центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 15 минут и привносили в бессывороточную среду.

Показана пролиферативная активность и дифференцировочный отклик мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика человека при добавлении 10% лизата тромбоцитов в среду культивирования. Установлено, что внесение тромболизата в специализированную питательную среду для культивирования стволовых обеспечивает получение качественного клеточного трансплантата в те же сроки, что и при культивировании с эмбриональной телячьей сывороткой. Полученные данные позволяют рекомендовать использование лизата тромбоцитов в качестве альтернативы ксеногенной сыворотки.

Литература:

1. Сергеева Н.С., Шанский Я.Д., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Кувшинова Е.А., Мейснер И.С. Гены и клетки. — 2014. — Том IX. — № 1. — С. 77–85.

МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА С ОЛИГОЛАКТИДАМИ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ В МОДЕЛИ *IN VITRO*

Т.В. Толстова¹, М.Г. Дроздова¹, Т.Н. Попырина², Т.С. Демина², Т.А. Аكوпова², Е.А. Марквичева¹

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

² ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

e-mail: balabanovtv88@gmail.com

Ключевые слова: хитозан, биоматериалы, тканевая инженерия, мезенхимальные стромальные клетки.

Природные полимер хитозан (Chit) используют как биоматериал для получения матриксов благодаря его биосовместимости и способности к биодеградации. Однако, Chit матриксы обладают низкой механической прочностью, а скорость их биодеградации недостаточно высокая. Создание композитных матриксов на основе Chit позволяет преодолеть эти недостатки, а также регулировать скорость их биодеградации и гидрофильно-гидрофобный баланс. Эти параметры определяют направленность дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток (МСК), которые обладают большим потенциалом в тканевой инженерии. Цель работы — получение плёнок (2D) и макропористых гидрогелей (3D) на основе

сополимеров хитозана, изучение их физико-химических свойств и культивирование на/в них различных типов клеток в модели *in vitro*. Сополимеры Chit (ММ 60 кДа, СД 0.9) с олиго(L,L- и /L,D-лактидами с ММ 5 кДа (Chit-L,L и Chit-L,D, соответственно) получали методом твердофазного синтеза. Показано, что структура матрицос представляла собой систему взаимосвязанных макропор со средним размером пор в диапазоне 50–250 нм (конфокальная лазерная микроскопия). Отсутствие цитотоксичности подтвердили путем культивирования клеток мышечных фибробластов L929 в экстрактах, полученных после инкубации гидрогелей в среде DMEM (10% FBS) — МТТ-тест. Культивирование клеток острого моноцитарного лейкоза человека (THP-1) в гидрогелях не приводило к их активации (ИФА на TNF- α и IL-6). Показано, что «химия и топография поверхности» гидрогелей обеспечивала адгезию клеток L929 и МСК (конфокальная микроскопия), рост и пролиферацию в течение 7–14 дней (МТТ-тест). Для изучения дифференцировки МСК использовали 2D пленки. Определяли активность щелочной фосфатазы, а также уровни экспрессии генов-маркёров Runx2, ALPL, SPP1 (ПЦР в режиме реального времени). Окрашивание везикул, содержащих триглицериды, и активность ADIPOQ, PPAR γ (ПЦР) применяли для доказательства адипогенеза. Показано, что все сополимерные плёнки поддерживали пролиферацию и дифференцировку МСК, при этом Chit-L,D усиливали их остеогенный, а Chit-L,L — адипогенный потенциал. Таким образом, полученные матрицосы являются перспективными биоматериалами для регенеративной медицины. Это исследование частично финансировано Российским научным фондом (номер гранта 22-13-00261).

РЕКОНСТРУКЦИЯ СТРУКТУРЫ ФИБРОТИЧЕСКОГО ФОКУСА КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА *IN VITRO*

А.Е. Толстолужинская², Н.А. Басалова¹,
Е.С. Новоселецкая¹, М.Н. Карагяур^{1,2},
Р.Ю. Еремичев¹, А.Ю. 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

e-mail: a.luzh@yandex.ru

Ключевые слова: фиброз, фибротический фокус, сфероид, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, миофибробласты.

Фибротический фокус является основной морфофункциональной единицей при развитии фиброза различных тканей, в том числе фиброза лёгких. Такой фокус состоит из ядра неправильно уложенных специфических белков внеклеточного матрикса (ВКМ), синтезируемых миофибробластами и их предшественниками, расположенными на периферии ядра. Поскольку фибротический фокус является одним из ключевых объектов для изучения механизмов регуляции и прогрессирования фиброза, необходима разработка релевантной модели данной морфофункциональной структуры. Поэтому основная цель данной работы заключалась в реконструкции фибротического фокуса *in vitro*.

Для получения ядра фибротического фокуса собирали сфероиды, образованные миофибробластами, на различных культуральных средах. Полученные сфероиды подвергали децеллюляризации (Новоселецкая, 2020).

Структуру сфероидов и децеллюляризованных сфероидов (децелл-сфероид) оценивали с помощью конфокальной микроскопии и дот-блоттинга. Децелл-сфероиды децеллюляризовали миофибробластами и на полученной модели «фибротического фокуса *in vitro*» оценивали их функциональную активность.

Было показано, что культуральная среда, содержащая эмбриональную бычью сыворотку, аскорбиновую кислоту и трансформирующий фактор роста бета (TGF β) способствует сборке сфероидов и отложению специфических компонентов фибротического ВКМ, включая коллаген I типа и EDA-фибронектин. Децелл-сфероиды нетоксичны и могут быть децеллюляризованы с помощью фибробластов. Фибробласты в составе децелл-сфероидов могут дифференцироваться в миофибробласты под влиянием TGF β . Миофибробласты были способны дедифференцироваться в фибробласты и разрушать ВКМ децелл-сфероидов после обработки внеклеточными везикулами мезенхимных стромальных клеток (МСК), обладающими установленными антифибротическими свойствами (Басалова, 2020).

Таким образом, нами разработана модель, воспроизводящая клеточный состав и микроокружение, характерные для фибротического фокуса. Мы показали, что миофибробласты в составе фибротического фокуса под воздействием внеклеточных везикул способны разрушать ядро фокуса, что может быть одним из возможных механизмов антифибротического действия МСК. Данная система может быть использована в качестве модельного 3D объекта для изучения *in vitro* динамики формирования и деградации фибротического фокуса (грант РФФИ № 20-315-90120 и 21-315-70002).

Литература:

1. Novoseletskaya E., Grigorieva O., Nimiritsky P et al. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. № 9. P. 1–25.

D-АСПАРАГИН УЛУЧШАЕТ ПРИЖИВЛЕНИЕ БИОПОЛИМЕРНОГО СКАФФОЛДА КОЖИ ПОСЛЕ РАННЕЙ НЕКРЭКТОМИИ

А.И. Трофименко, А.Х. Каде

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

e-mail: artemtrofimenko@mail.ru

Ключевые слова: желатин, альгинат натрия, скаффолд, кожа.

Разработка биодеградируемых скаффолдов является перспективным подходом к решению проблемы дефицита донорского материала у пациентов с обширными ожогами кожи.

Цель — изучить влияние D-аспарагина на приживление биополимерного скаффолда для замещения дефектов кожи после некрэктомии ожоговых ран в эксперименте у крыс.

В исследовании на 20 крысах-самцах, после моделирования ожога кожи III ст. [1], проводили раннюю некрэктомию с одномоментной имплантацией скаффолда на основе альгината натрия, желатина тип А и винилтриэтоксисилана [2], в группе 1 без и в группе 2 с D-аспарагином.

Окраску микропрепаратов кожи (30-е сутки) выполняли по протоколу для гематоксилин-эозина, а также по Маллори. Для фрактального анализа фибриллярной структуры внеклеточного матрикса применяли плагин Fraclac 2.5 (NIH, США) для «Image J 1.5.1j8». При

помощи «box-counting method» определяли значение фрактальной размерности (ФР) и лакуарности (ЛК) [3].

В группе 1 эпидермис истончен, наблюдается грубая дезорганизация его слоев, нечеткая граница перехода эпидермиса в дерму, сосочковый и сетчатый слои дермы не дифференцируются (видна ячеистая структура скаффолда), в дерме видны выраженные признаки воспалительной инфильтрации, множество гигантских и эпителиоидных клеток, большое количество крупных, варьируемых по диаметру сосудов.

В группе 2 толщина эпидермиса на 45,5% ($p=0,002$) больше, чем в группе сравнения. Прослеживается дифференциация эпидермиса на слои, виден переход эпидермиса в дерму, при этом также отсутствует разделение на сосочковый и сетчатый слои дермы (видна ячеистая структура скаффолда), выявлены единичные гигантские и эпителиоидные клетки, умеренное количество крупных, тонкостенных сосудов.

Различия в ремоделировании структуры фибриллярного компонента внеклеточного матрикса в зоне имплантации скаффолда нашли подтверждение в изменении ФР и ЛК. В группе 2 ФР на 2,9% больше ($p=0,042$) и ЛК на 5 % меньше ($p=0,028$), чем в группе 1.

Таким образом, включение D-аспарагина оказывает положительное влияние на приживление и ремоделирование биополимерного скаффолда на 30-е сутки от имплантации после некрэктомии ожоговых ран.

Литература:

1. Cai E.Z., Ang C.H., Raju A. et al. Arch Plast Surg. 2014. V. 41. № 4. P. 317.
2. Kade A.Kh., Trofimenko A.I., Bogdanov S.B. et al. Medical News of North Caucasus. 2021. V. 16. № 2. P. 184.
3. Taniguchi B.A., Breda M.R.S., Nogueira R.M.B. et al. 2018. V. 11. P. 5241.

ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТ КАК ИНСТРУМЕНТ ИМИТАЦИИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ

Е.А. Трусова¹, М.С. Холина¹, Д.С. Святославов², С.И. Самойлова², И.В. Решетов², К.В. Шайтан¹, А.П. Бонарцев¹

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: ekaterina.trusova2001@gmail.com

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, полиоксисилканоаты, 3D-модели культур клеток, рак, регенеративная медицина.

Данная работа посвящена разработке и анализу структуры 3D-модели раковой опухоли, ее сравнению с опухолями пациентов с плоскоклеточным раком языка и ротоглотки. 3D-культуры являются перспективными моделями тестирования на этапе доклинических испытаний и должны обладать максимально близкими к условиям *in vivo* свойствами [1]. Гипотеза заключалась в том, что наиболее подходящими компонентами имитации микроокружения опухоли являются микросферы диаметром 90 и 75 мкм, тогда как использование микросфер диаметром 205 мкм не позволило разработать 3D-модель опухоли.

Сфероиды были получены методом культивирования клеток линии HEp-2 (плоскоклеточной карциномы гортани) на низкоадгезивной поверхности с добавлением высокопористых микросфер из поли-3-оксибутирата (ПОБ) различного диаметра. При достижении 80% конfluence, жизнеспособность клеток оценивалась

с помощью окрашивания трипановым синим при помощи подсчета в камере Горяева (Freshney).

Микросферы из ПОБ использовались в качестве имитации микроокружения, в частности, элементов микросудистого русла. В качестве источника ПОБ использовался штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б [2]. Для получения микросфер диаметром 205, 90 и 75 мкм применялся метод «water-in-oil-in-water» (W1/O/W2), позволяющий получать микросферы с высокой пористостью (более 90%). Детекция пролиферативной активности клеток в сфероиде проводилась с помощью МТТ-теста. Анализ морфологии клеток, структуры сфероидов и диаметра микросфер проводился методами СЭМ и конфокальной микроскопии (с использованием флуоресцентных красителей Calcein AM и Hoechst 33342). Полученные сфероиды имели характерные для данной 3D-модели зоны, морфология клеток была приближенной к нативной. Оценка корреляции сфероидов с биопсией опухолей пациентов проводилась с помощью иммунофенотипирования. В качестве молекулярных мишеней были использованы антитела к биомаркерам p16INK4A и p53 (DO-7). Повышенная экспрессия p16 свидетельствует о ВПЧ-положительном статусе клеточной линии, преобладание дикого типа p53 — об отсутствии быстрого развития опухоли. Полученные результаты иммуногистохимического окрашивания коррелируют с клиническими образцами. Включения в модель микросфер диаметром 205 мкм не показало никакого эффекта.

Тесты резистентности модели к препаратам доксорубин и патлитаксел (таксол) показали, что 3D-модели с микросферами диаметром 90 и 75 мкм проявляют больший уровень лекарственной устойчивости к обоим препаратам, что характерно для естественных опухолевых образований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09099, на оборудовании ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Литература:

1. Gianluca Colella, Flavio Fazioli, Michele Gallo et al. Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19 № 615.
2. V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V. et al. Preparative Biochemistry and Biotechnology 2017. V. 47. N. 2. P. 173

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ НА СЕКРЕТОРНО-СИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Е.П. Турищева¹, М.С. Вильданова¹, П.А. Вишнякова^{2,3}, Д.К. Матвеева⁴, Г.Е. Онищенко¹, Е.А. Смирнова¹

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

² НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, лаборатория Регенеративной медицины, Москва, Россия

³ РУДН, кафедра гистологии, Москва, Россия

⁴ ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, лаборатория Клеточной физиологии, Москва, Россия

e-mail: kitten-caterina@yandex.ru

Ключевые слова: абсцизовая кислота, гиббереллиновая кислота, фибробласты, миофибробласты, фиброз, дифференцировка, проколлаген, фибронектин.

Регуляция синтеза и секреции компонентов внеклеточного матрикса дермальными фибробластами может позволить ускорять заживление ран и подавлять развитие фиброза. Известно, что растительные гормоны абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллиновая кислота (ГК) могут оказывать влияние на секреторную активность некоторых типов клеток человека (β -клеток островков Лангерганса, энтероэндокринных клеток, мезенхимных стромальных клеток). Поэтому целью нашей работы было исследовать влияние растительных гормонов АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность культивируемых дермальных фибробластов человека.

Фибробласты синтезируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса, среди которых наиболее распространёнными в соединительной ткани коллагеновыми и неколлагеновыми белками являются проколлаген I и фибронектин, соответственно. Анализ уровня синтеза проколлагена I и фибронектина с помощью вестерн-блоттинга показал, что АБК вызывает повышение уровня синтеза проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах, а ГК — снижение уровня синтеза проколлагена I. Анализ уровня секреции проколлагена I и фибронектина с помощью ИФА показал, что АБК стимулирует секрецию проколлагена I и не влияет на секрецию фибронектина, а ГК стимулирует секрецию фибронектина, не влияя при этом на секрецию проколлагена I. Полуколичественный анализ содержания коллагеновых и неколлагеновых белков во внеклеточном матриксе после культивирования с АБК и ГК показал, что при действии АБК содержание коллагеновых и неколлагеновых белков в матриксе, формируемом дермальными фибробластами, повышается, а при действии ГК содержание коллагеновых белков снижается.

В организме млекопитающих фибробласты способны дифференцироваться в миофибробласты, играющие важную роль в заживлении ран. Оценка уровня синтеза основного маркера миофибробластов α -SMA с помощью вестерн-блоттинга и подсчёт доли миофибробластов в популяции дермальных фибробластов с помощью иммуноцитохимического выявления α -SMA показал, что АБК стимулирует увеличение уровня синтеза α -SMA и количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, а при действии ГК уровень синтеза α -SMA снижается и количество миофибробластов уменьшается.

Таким образом, АБК стимулирует синтез и отложение коллагеновых и неколлагеновых белков дермальными фибробластами и повышает количество миофибробластов, что может быть использовано для ускорения заживления ран. В свою очередь, ГК подавляет синтез и отложение коллагеновых белков, что может быть использовано для подавления развития фиброза. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Е.А. Тырина, Л.Б. Буравкова

ГНЦ РФ — ИМБП РАН, Москва, Россия

e-mail: eagolikovamsu@gmail.com

Ключевые слова: микрогравитация, сокультивирование, МСК, мононуклеары пуповинной крови.

Известно, что длительные космические полеты оказывают негативное влияние на гемопоэз, поэтому актуальными являются исследования влияния микрогравитации на гемопоэтические клетки различной степени коммитирования. Важная роль в поддержании гемопоэтического микроокружения принадлежит мезенхимальным стромальным клеткам (МСК), которые участвуют в создании ниши для пролиферации гемопоэтических предшественников. Целью данной работы было изучение эффектов 21-суточного моделирования микрогравитации в модели совместного культивирования гемопоэтических клеток, выделенных из пуповинной крови, и МСК.

Мононуклеары пуповинной крови и МСК культивировали в течение 72 часов, после чего удаляли неадгезированные клетки. МСК с ассоциированными к ним гемопоэтическими клетками продолжали культивировать в статическом контроле и на машине случайного позиционирования (RPM) в течение 21 суток. Оценивали количество суспензионной и адгезированной фракций гемопоэтических клеток. С помощью проточной цитометрии определяли иммунофенотип ассоциированных с МСК клеток, а также клоногенный потенциал суспензионной фракции (количество колониеобразующих единиц — КОЕ).

После экспозиции на RPM количество ассоциатов МСК и гемопоэтических клеток не изменилось. При этом доля CD45+ клеток, в среднем, была в полтора раза ниже при моделировании эффектов микрогравитации. В составе МСК-ассоциированной фракции наблюдали снижение доли клеток моноцитарной и эритроидной линии, а также увеличение доли клеток гранулоцитарного ростка. Кроме этого, отмечалось снижение доли ранних гемопоэтических предшественников. Количество суспензионных клеток и содержащихся среди них КОЕ достоверно не изменилось после экспозиции на RPM. Однако произошло снижение доли унипотентных КОЕ-гранулоцитов и увеличение доли КОЕ-моноцитов. Общая клеточность колоний была идентичной в обеих группах. При этом иммунофенотипирование колоний показало значительное снижение доли клеток эритроидной линии, что свидетельствует о более коммитированном составе эритроидных предшественников при моделировании эффектов микрогравитации.

Таким образом, 21-суточное моделирование эффектов микрогравитации в модели сокультивирования МСК и гемопоэтических клеток, приводило к снижению доли гемопоэтического компартмента, а также изменению соотношения и распределения клеток различных гемопоэтических ростков между фракциями. Снижение доли ранних гемопоэтических предшественников в МСК-ассоциированной фракции и клеточности эритроидных колоний в совокупности может свидетельствовать о преобладании коммитированности гемопоэтических клеток в условиях моделирования микрогравитации. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04026.

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИНИЦИАЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

П.А. Тюрин-Кузьмин, В.И. Чечехин, К.Ю. Кулебякин, В.С. Попов, Н.И. Калинина, В.А. Ткачук

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

e-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, мезенхимные стволовые клетки, инициация дифференцировки, норадреналин, гормональная регуляция.

Накопление избыточного веса и ожирение являются одними из ключевых проблем современной медицины. Проблема ожирения вызвана, главным образом, преобладанием неправильной культуры питания вкупе с сидячим образом жизни и работы большинства людей и все возрастающим постоянным психоэмоциональным стрессом. Кроме того, генетическая предрасположенность или нарушения метаболизма могут приводить к развитию ожирения. Ассоциированные с ожирением заболевания, такие как сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания являются одними из ведущих причин инвалидизации и потери трудоспособности людей. Ключевую роль в процессе развития ожирения играет нарушение организменных процессов обновления и поддержания здорового состояния жировой ткани. При этом в жировой ткани нарушаются процессы закладки новых адипоцитов из резидентных стволовых клеток (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, МСК). В результате в жировой ткани накапливаются крупные старые гипертрофированные адипоциты, демонстрирующие нарушенную чувствительность к гормональным сигналам и отсутствие способности к продукции важных для метаболического здоровья ткани адипокинов. С другой стороны, в здоровой жировой ткани могут закладываться так называемые бежевые адипоциты. Это клетки, родственные белым адипоцитам, но по своим функциям и морфологии похожие на бурые адипоциты. Они способны сжигать жиры, рассеивая энергию в тепло. Они эффективно редуцируют объем жировой ткани без накопления продуктов метаболизма триглицеридов, что происходит в случае повышения катаболической активности белых адипоцитов. Таким образом, для предотвращения развития и прогрессии ожирения перспективным является подход к стимуляции процессов закладки новых молодых белых адипоцитов в жировой ткани и индукции их дифференцировки в бежевые адипоциты.

В данной работе мы выяснили молекулярные механизмы регуляции коммитирования и потенциации МСК в различные направления дифференцировки, важные для поддержания здоровья жировой ткани и эффективного и безопасного лечения ожирения и сопряженных с ним болезней. Мы показали уникальный сигнальный феномен гетерологической сенситизации МСК, при котором появляется группа клеток с повышенной чувствительностью к норадреналину [1,2]. При их стимуляции появляется группа «инициированных» к дифференцировке МСК. Для того, чтобы выбрать направление дифференцировки между белыми и бежевыми адипоцитами, МСК должны войти в это инициированное состояние, из которого они уже коммитируются и направляются в выбранное направление. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00311 «Механизмы межклеточной коммуникации в поддержании гомеостаза и регуляции обновления жировой ткани».

Литература:

1. Tyurin-Kuzmin, P. A., Fadeeva, J. I., Kanareikina, M. A., et al. Sci. rep., 2016. 6(1), 1–9.
2. Tyurin-Kuzmin, P. A., Dyikanov, D. T., Fadeeva, et al. Sci. data, 2018. 5(1), 1–8.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ИНКУБАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (НКВИ)

В.А. Уметбаева, О.И. Желтова, И.В. Меледина

ФГБУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

e-mail: nika_kanke@mail.ru

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция (НКВИ), иммунитет.

Влияние НКВИ на дифференцировку и активность клеток иммунной системы активно исследуется. Согласно литературным данным НКВИ характеризуется общей лимфопенией, ослаблением Т-клеточного звена иммунитета [1,2,3], снижением количества NK-клеток [1,2], фагоцитарной активности нейтрофилов [2], недостаточностью В-лимфоцитов [1], повышением концентрации IgA и IgM [1], IL-8 [1], повышением поглотительной способности и ферментативной активности нейтрофилов [1].

Нами было обследовано 8 человек, находившихся в инкубационном периоде заболевания, из них 2 мужчин и 6 женщин, средний возраст 44 года; 5 из них переболели НКВИ в легкой форме, у троих было среднетяжелое течение заболевания. У пациентов в целом по группе достоверно снижено абсолютное и относительное количество CD8+ Т-лимфоцитов, нейтрофилов, продуцирующих активные формы кислорода, достоверно снижено количество NK-клеток, по сравнению с контрольной группой, при этом увеличено процентное количество моноцитов. Также, мы выявили достоверные различия в количестве моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода между пациентами с легкой и средней степенью тяжести. В группе пациентов со среднетяжелым течением заболевания достоверно снижено количество моноцитов и нейтрофилов, продуцирующих активные формы кислорода, по сравнению с контрольной группой. У пациентов с легкой степенью тяжести течения заболевания достоверно снижен уровень CD8+ Т-лимфоцитов, NK-клеток, нейтрофилов, продуцирующих активные формы кислорода, а также повышено процентное содержание моноцитов в сравнении с контрольной группой. По общему анализу крови есть тенденция к абсолютному моноцитозу в целом по группе, достоверно выше относительный моноцитоз в целом по группе и в группе с легким течением заболевания. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что НКВИ даже в инкубационном периоде влияет на активность различных клеток иммунной системы.

Литература:

1. Кальгина Г.А., Курлаева Л.В. и др. Восьмой сборник научных работ, посвященный 55-летию Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии. Тюмень, 2020, С. 70–76.
2. Кречетова Л.В., Инвиева Е.В. и др. Акушерство и гинекология, Москва 2020. С. 75–85.
3. Никитин Ю.В., Александрова Е.В. и др. Лечение и профилактика, Санкт-Петербург, 2021. С. 12–20.

СОЗДАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ

**В.С. Усатова¹, М.А. Берестовой¹,
Н.М. Мишина², А.В. Иваненко³, Д. Джэппи¹,
А.В. Розов¹, В.В. Белоусов^{1,2}**

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий
ФМБА, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва,
Россия

³ Центр высокоточного редактирования
и генетических технологий для биомедицины,
РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

e-mail: usatova.v@fccps.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры.

В данной работе был разработан подход для исследования внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов в течение нейральной дифференцировки, а также на модели ишемической патологии нервной системы. Для этого с помощью CRISPR/Cas9 системы было создано несколько линий ИПСК человека, стабильно экспрессирующих генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры HyPer7 [2], SoNar [3] и SynHer3s [4], детектирующие ключевые показатели окислительно-восстановительных процессов — H₂O₂, соотношение NAD⁺/NADH и pH соответственно.

В данном исследовании была осуществлена полная дифференцировка линии ИПСК-HyPer7 в нейральном направлении до получения функционально зрелых нейронов. В процессе дифференцировки проводились прижизненные наблюдения за изменением внутриклеточных окислительно-восстановительных параметров с помощью флуоресцентной микроскопии. Было обнаружено, что на стадии получения нейральных предшественников происходит значительное повышение уровня продукции H₂O₂ в цитоплазме большинства клеток по сравнению с клетками на предшествующих и последующих стадиях дифференцировки.

Далее была исследована возможность применения линии ИПСК-HyPer7 в экспериментах по моделированию ишемической патологии нервной системы, на примере нейроглиальных органоидов человека. Моделью ишемии-реперфузии являлась кислородно-глюкозная депривация, с последующей реоксигенацией и восстановлением контрольного уровня глюкозы в среде. Реализацию требуемых условий осуществляли на экспериментальной установке [5], которая позволяет точно и быстро контролировать изменения уровня кислорода в среде в процессе флуоресцентной микроскопии. Было обнаружено, что падение уровня кислорода в среде сопровождается изменением уровня H₂O₂ в цитоплазме клеток в составе органоидов.

Литература:

1. Kostyuk A.I., Demidovich A.D., Kotova D.A. et al. International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20. 4200.
2. Pak V.V., Ezerina D., Lyublinskaya O.G. et al. Cell metabolism. 2020. V. 31, № 3. P.642–653.
3. Zhao Y., Hu Q., Cheng F. et al. Cell metabolism. 2015. V. 21, № 5. P. 777–789.

4. Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A. et al. Chemical Communications. 2018. V. 54, № 23. P. 2898–290.
5. Kelmanson I.V., Shokhina A.G., Kotova D.A. et al. Redox Biology. 2021. V.48. 102178

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ И ФОСФОЛИПАЗ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

**В.А. Усачёв¹, М.В. Воронцова², К.Ю. Кулебякин^{1,2},
П.А. Тюрин-Кузьмин¹, И.В. Зубарев¹**

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

² Институт Регенеративной Медицины, Медицинский
научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: usachjov-vova@mail.ru

Ключевые слова: паратиреоидный гормон, аденилатциклаза, фосфолипаза, МСК, дифференцировка.

Мутации, происходящие в рецепторе или G α -субъединице G-белка, нарушают передачу внутриклеточного сигнала и вызывают различные физиологические нарушения. Так, например, мутация в G α , связанного с PTH-рецептором, вызывает псевдогипопаратиреоз с наследственной остеодистрофией Олбрайта. Заболевание вызвано нарушением процессов дифференцировки клеток, обрывая передачу сигнала паратиреоидного гормона [1]. При подобных нарушениях, мишенью для фармакологических препаратов может служить следующее звено GPCR-сигнального пути — аденилатциклазы и фосфолипазы C β .

Целью данной работы являлось выявление изменения профиля экспрессии различных изоформ аденилатциклазы и фосфолипазы C β в процессе дифференцировки МСК из разных источников. Методом real-time PCR был определен уровень экспрессии аденилатциклазы и фосфолипазы C β на 5, 10 и 15 сутки адипогенной и остеогенной дифференцировки МСК, полученных у здоровых доноров из жировой ткани и надкостницы.

В результате было показано, что в процессе дифференцировки МСК в адипогенном и остеогенном направлениях происходит изменение экспрессии некоторых изоформ аденилатциклазы и фосфолипазы C β . Так аденилатциклаза 1 растет при остеогенной дифференцировке в МСК из жировой ткани, но падает в МСК из надкостницы и растет при адипогенной дифференцировке в обеих популяциях МСК. Аденилатциклаза 3 в МСК из надкостницы возрастает при остеогенной дифференцировке и МСК из жировой ткани при адипогенной дифференцировке. Экспрессия аденилатциклазы 6 падает при остеогенной дифференцировке в МСК из жировой ткани, но растет в МСК из надкостницы и растет при адипогенной дифференцировке в обеих популяциях МСК. Аденилатциклаза 7 падает во всех источниках и дифференцировках по сравнению с контролем. Аденилатциклаза 8 растет при остеогенной дифференцировке МСК из жировой ткани и снижается в МСК из надкостницы.

Фосфолипазы C β 1 и 3 ведут себя схожим образом. В МСК надкостницы они снижают свою экспрессию при адипогенной дифференцировке и незначительно возрастает при остеогенной. В МСК жировой ткани наблюдается различия во времени ответа: при адипогенной дифференцировке максимальный уровень экспрессии наблюдается на 5 сутки дифференцировки и постепенно снижается. В то время как их экспрессия при остеогенной

дифференцировке постепенно растет, достигая максимума к 15 суткам.

Таким образом, наши результаты впервые описывают феномен переключения экспрессии различных типов аденилатциклаз и фосфолипаз C β при дифференцировке МСК. Подобное переключение вероятно необходимо для регуляции направления и эффективности дифференцировки.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 19-75-30007, Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека).

Литература:

1. Thiele S., Mantovani G., Barlier A. et al. Eur J Endocrinol. 2016. V. 175. P. 1–17.

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ И СЕКРЕТОРНЫЙ ПРОФИЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Д.Ю. Усупжанова, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, В.А. Никитина, Т.Ф. Маливанова, Е.Е. Ломоносова, А.А. Самойлов

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им.А.И. Бурназяна, Москва, Россия

e-mail: usupzhanova94@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, малые дозы радиации, рентгеновское излучение, иммунологический профиль, секреторный профиль.

На протяжении жизни человек неизбежно подвергается воздействию малых доз (от 10 до 100 мГр [1]) ионизирующего излучения (ИИ) [2]. Учитывая неизбежно растущее количество источников малых доз ИИ в современном мире, можно сказать, что точная оценка рисков, связанных с облучением в малых дозах, является важной задачей общественного здравоохранения [2]. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК), являющиеся регенеративным резервом взрослого организма, выступают перспективной моделью для изучения эффектов облучения. Благодаря своей способности к самоподдержанию, МСК находятся в организме человека длительный период времени и могут подвергаться нескольким раундам облучения, накапливая в себе произошедшие изменения и передавая их следующим поколениям клеток, поскольку обладают потенциальными к дифференцировке. В конечном счете, изменения, произошедшие в МСК, отражаются на организме человека в целом [3].

В исследовании иммунологического профиля было показано, что экспрессия поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны человека (CD90, CD73, CD105, CD44) изменяется под влиянием ИИ в дозах 50, 100 и 250 мГр в ранние сроки культивирования после облучения (до 16 дней). Наблюдаемые эффекты указывают на изменения важнейших функциональных характеристик МСК (в частности, степени стволовости и потенциалов к дифференцировке), а сами поверхностные антигены представляются перспективным критерием оценки последствий воздействия ИИ.

В исследовании секреторного профиля клеток было показано, что малые и средние дозы ИИ приводят к развитию противоположных воспалительных реакций в ранние

сроки культивирования после облучения (48 часов): облучение малыми дозами 50 и 100 мГр приводит к повышению концентрации ИЛ-6 и снижению концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах клеток, в то время как для средних доз 250 и 1000 мГр наблюдается обратная ситуация. В отдаленные сроки культивирования после облучения (43 и 64 день) для всех исследуемых облученных групп МСК показано снижение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8, свидетельствующее об угнетении их функциональной иммуномодулирующей активности.

Обобщая полученные результаты, был сделан вывод о влиянии малых доз рентгеновского излучения на функциональные характеристики МСК, в частности, в отдаленные сроки культивирования после облучения эффекты малых доз сопоставимы с эффектами средних доз ИИ и, в целом, свидетельствуют об угнетении функциональной активности клеток.

Литература:

1. The 2007 Recommendations of the ICRP. ICRP publication 103. 2007. V. 37 (2–4). P. 1–332.
2. Fazel R, Krumholz H, Wang Y. J Vasc Surg. 2009. V. 50 (6). P. 1526–1527.
3. Squillaro T, Galano G, De Rosa R. et al. Stem Cells. 2018. V. 36 (8). P. 1146–1153.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ/ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В РАЗЛИЧНЫХ ОЧАГАХ ИНФЕКЦИИ ИЗ ЛЕГКИХ ПАЦИЕНТОВ, БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Е.Г. Уфимцева¹, Н.И. Еремеева^{2,3}

¹ НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

² Институт дезинфектологии ФБУН ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ УНИИФ — филиал ФГБУ НМИЦ ФПИ Минздрава России, Екатеринбург, Россия

e-mail: ufim1@ngs.ru

Ключевые слова: пациенты с туберкулезом легких, очаги инфекции, мезенхимные стволовые/стромальные клетки, регенерация альвеол.

Туберкулез (ТБ) — заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), с образованием широкого спектра патологических очагов в легких пациентов с локальным или обширным ремоделированием альвеолярных тканей, известное как фиброз. Одной из актуальных проблем регенеративной медицины в современной фтизиатрической практике является восстановление структурной и функциональной целостности поврежденных ТБ тканей легких пациентов. Предполагается, при ТБ легких мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) способны участвовать в снижении воспалительной/иммунной реакций, дифференцируясь в фибробласты, и в регенерации альвеол путем трансдифференцировки в клетки легочного эпителия [1]. Однако, участие МСК в этих процессах у пациентов, больных ТБ, до сих пор не было исследовано, делая актуальным изучение их роли в патогенезе ТБ инфекции в легких человека.

Для исследования клеток, инфильтрующих ткани легких пациентов, больных ТБ, нами была разработана методика получения *ex vivo* культур клеток из операционного материала пациентов из стенок каверн/туберкулем и, параллельно, районов, удаленных от макро-ТБ очагов [2]. На 16–18 часах *ex vivo* культивирования первичные

культуры, полученные из различных ТБ очагов резектатов легких 30 пациентов, состояли из макрофагов и других клеток иммунитета, как правило, с отсутствием фибробластов [2, 3].

Развитие методики *ex vivo* культивированием клеток до 5–7 дней позволило не только выявить ряд характеристик Mtb [4], но и оценить вероятное присутствие МСК в первичном инфильтрате клеток из резектатов легких пациентов по появлению колоний делящихся клеток с характерной для МСК фибробластоподобной морфологией. В результате, значительное количество МСК выявили только для инфильтрата клеток из стенки туберкулемы пациента 27. Для инфильтратов клеток как из удаленного района легкого этого пациента, так и из различных ТБ очагов из резектатов легких других пациентов обнаружили только единичные МСК или полное их отсутствие вне зависимости от воспалительной и микробицидной активации клеток, зараженности их Mtb и степени фиброза в исследованных тканях. Изучение участия МСК в патогенезе и ремоделировании легких пациентов, больных ТБ, требует продолжения для разработки новых методов и препаратов для эффективного восстановления функций легочного эпителия.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН и ЦКП «Протеомный анализ» ФИЦ ФТМ (соглашение № 075-15-2021-691). Финансирование бюджетное.

Литература:

1. Zhang X., Xie Q., Ye Z. et al. *Front. Immunol.* 2021. V. 12. Art. № 695278.
2. Ufimtseva E., Ereemeeva N., Petrunina E. et al. *PLoS ONE.* 2018. V. 13. № 2. Art. № e0191918.
3. Ufimtseva E.G., Ereemeeva N.I., Umpeleva T.V. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. № 3452.
4. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А. и др. Пат. РФ № 2652882. Бюл. № 13. 2018.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ НА СЕКРЕЦИЮ КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ IN VITRO ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ IL-12

Ф.А. Фадеев, А.Д. Никанорова

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

e-mail: fdf79@mail.ru

Ключевые слова: дендритные клетки, стимуляция созревания, цитокины, интерлейкин 12.

Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в инициации адаптивного иммунного ответа и являются перспективным средством для клеточной терапии, позволяющим стимулировать направленный антигенспецифический иммунный ответ. ДК, культивируемые *in vitro*, используют для лечения различных заболеваний, в первую очередь, онкологических. Противоопухолевая иммунотерапия направлена, в основном, на активацию Т-звена иммунитета и формирование клонов эффекторных Т-хелперов 1 типа (Тх1) и цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевым клеткам. Продуцируемый ДК интерлейкин-12 (IL-12) во многом определяет направление дифференцировки наивной CD4+ Т-клетки в Тх1, и в целом обуславливает развитие иммунного ответа в сторону активации клеточного звена.

В данной работе была проведена оценка различных способов стимуляции созревания культивируемых *in vitro* ДК на секрецию ими IL-12. ДК были получены путем обработки моноцитов из донорской крови цитокинами (GM-CSF и IL-4). Полученные незрелые ДК подвергали воздействию различными смесями для стимуляции созревания:

- TNF α ;
- «коктейль» TNF α + IL-1 + IL-6 + PGE2;
- poly I:C;
- липополисахарид (LPS)
- лизат опухолевых клеток SK-MEL-2.

Экспрессию рецепторов ДК определяли методом точной цитофлуориметрии. Уровень секреции цитокинов определяли методом ИФА.

При использовании разных смесей отмечены существенные различия в уровне экспрессии ДК поверхностных рецепторов (данные не представлены), хотя, в целом, их иммунофенотип соответствовал зрелым ДК (CD14+ CD11c++ HLA-DR++ CD86++ CD40+ CD83+).

Уровень секреции IL-12 при использовании лигандов TLRs (polyI:C, LPS), а также лизата клеток, содержащего DAMPs, достоверно не отличался от контроля (ДК без стимуляции созревания), несмотря на то, что связывание TLRs с лигандами должно активировать сигнальные пути, усиливающие транскрипцию генов, кодирующих IL-12. ДК, подвергшиеся воздействию TNF α , также демонстрировали невысокий уровень секреции IL-12, несмотря на то, что TNF α является активатором pF-кВ сигнального пути, усиливающего экспрессию генов, кодирующих IL-12. Максимальный уровень секреции IL-12 (20,67 \pm 12,06 пг / мл) отмечен при использовании «коктейля», что можно объяснить сочетанным действием входящих в его состав компонентов. Примечательно, что, содержащийся в его составе PGE2, по данным литературы, ингибирует синтез IL-12.

Таким образом, использование «коктейля» из TNF α + IL-1 + IL-6 + PGE2 для стимуляции созревания ДК обеспечивает наиболее высокий уровень секреции IL-12. Полученные с его использованием ДК также имеют максимальный уровень экспрессии рецепторов, обеспечивающих миграцию ДК в лимфоузлы, в частности, CCR7 (данные не представлены). На этом основании можно сделать вывод, что «коктейль» является наиболее подходящим компонентом для стимуляции созревания ДК, получаемых *in vitro* для использования в противоопухолевой терапии.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ СКАФФОЛДОВ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А.Н. Файзулина, А.Д. Кручинина

ФГБОУ ВО Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

e-mail: a.d.kruchinina@mail.ru

Ключевые слова: коллагеновый скаффолд, децеллюляризация, антимикробная активность.

Увеличение количества реконструктивных и пластических операций обуславливает потребность в расширении производства биоматериалов для регенеративной медицины. Наиболее распространенным и доступным является сырье ксеногенного происхождения. Удаление клеток методами ферментативной или химической

обработки позволяет снизить иммуногенность биоматериала и получить децеллюляризованный коллагеновый скаффолд, пригодный для имплантации реципиенту [1]. Такие материалы находят применение в тканевой инженерии [2]. Перспективным направлением является разработка протоколов модификации биоматериалов с целью придания им антимикробной активности [3].

В настоящем исследовании были получены образцы децеллюляризованных коллагеновых скаффолдов на основе телячьего перикарда, отличающиеся лекарственным препаратом, сорбированном на поверхности: ванкомицином, амикацином и рифампицином. Эффективность процесса децеллюляризации оценивали путем количественного определения ДНК. Наличие антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* определяли диско-диффузионным методом.

Гетеротопическая имплантация образцов белым беспородным крысам показала отсутствие реакции отторжения. Децеллюляризованные коллагеновые скаффолды с антимикробной активностью полностью интегрировались в организм реципиента в течение 4–6 месяцев без усиления воспалительной реакции в ответ на имплантацию и появления дистрофических изменений по сравнению с контролем без антимикробной активности.

Полученные результаты могут быть прим. мы при разработке имплантируемых медицинских изделий на основе ксеноматериалов, предназначенных для направленной тканевой регенерации.

Литература:

1. Старцева О.И., Синельников М.Е., Бабаева Ю.В. и др. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019. № 8. С. 59–62.
2. Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истранов Л.П. и др. Архив патологии. 2015. № 6. С. 29–38.
3. Martí M., Frígols B., Serrano-Aroca A.J. *Vis. Exp.* 2018. V. 138. e57710.

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПЕРИИМПЛАНТНЫХ ТКАНЕЙ

**А.Л. Файзуллин, А.А. Земеров, А.С. Балкинский,
А.А. Бакулина, Е.И. Иванова, П.С. Тимашев¹**

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

e-mail: fayzullin_a_l@staff.sechenov.ru

Ключевые слова: цифровая патология, нейронные сети, морфометрический анализ, периимплантный фиброз, имплантаты, соединительнотканная капсула.

Оценка биологической совместимости имплантируемых биоматериалов должна включать анализ морфометрических характеристик и клеточного состава периимплантной соединительнотканной капсулы. К консервативным клеточным элементам капсулы относят гигантские многоядерные клетки инородных тел, фибробласты и сосуды. Соотношение этих компонентов меняется со временем и оказывает влияние на исход имплантации, включая резорбцию и фибротическую трансформацию окружающих имплантат тканей. Последние достижения в области искусственного интеллекта и цифровой патологии позволяют автоматизировать детекцию клеток, имеющих типичные морфологические особенности, на скан-изображениях гистологических препаратов.

Нами была разработана математическая модель для детекции гигантских многоядерных клеток инородных тел на скан-изображениях участков имплантаций. Для искусственной нейронной сети в рамках задач детекции и сегментации была использована архитектура сверточной нейронной сети U-Net, известная в области сегментации медицинских изображений своей скоростью и эффективностью в работе с ограниченным количеством данных. Характерной особенностью применения полносверточной нейронной сети является возможность сегментировать объекты на скан-изображении по классам, что позволяет повысить точность детекции клеток инородных тел. Модель была обучена на клетках с 20 скан-изображений гистологических препаратов имплантаций полилактидных скаффолдов. Валидация была проведена на 30 скан-изображениях. Ошибка модели на валидации составила 0,17. Детекция клеток морфотипов клеток инородных тел, фибробластов и эндотелия сосудов позволит с высокой точностью характеризовать соединительнотканную капсулу и описывать локализацию хромогенных меток в изображениях гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Проект поддержан грантом РФФ 22-15-00467.

ПРИМЕНЕНИЕ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ МИШЕННЫМИ ЛИГАНДАМИ, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**В.С. Федоров¹, Н.М. Юдинцева^{1,2},
Р.Б. Тагаева^{1,2}, М.А. Шевцов^{1,2}**

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Центр персонализированной медицины
НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

e-mail: fedorovvs.biotech@gmail.com

Ключевые слова: магнитные наночастицы, таргетная доставка, МРТ диагностика.

Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)) обладают рядом уникальных свойств, позволяющих их использовать для МРТ-диагностики и таргетной доставки лекарств. С целью повышения коллоидной устойчивости, биосовместимости, а также для осуществления поверхностной модификации ядра SPIONs покрывают различными полимерами [1].

Целью работы было создание панели мишенных конъюгатов на основе SPIONs для прижизненной диагностики туберкулеза (Тб) и опухолей головного мозга. SPIONs были синтезированы методом соосаждения из раствора солей железа, покрыты карбоксиметилдекстраном и функционализированы путем ковалентной сшивки с антителами anti-CD11b (Abcam, США) и anti-LAM (GRP, Германия), распознающими микобактерии. Для диагностики опухолей мозга использовали антитела anti-GD2, специфически взаимодействующие с ганглиозидом GD2 и ТКД-пептид, специфичный к мембранно-связанной форме белка теплового шока mHsp70 (Thermo Fisher, США) на поверхности клеток глиобластомы. В качестве контроля использовали конъюгат изотипическими антителами IgG₁. Для характеристики конъюгатов были использованы методы аналитической химии,

динамического светорассеяния и ЯМР-спектроскопии. Оценку взаимодействия конъюгатов с микобактериями и опухолевыми клетками в условиях *in vitro* выполняли с помощью методов конфокальной и электронной микроскопии.

Гидродинамический размер полученных мишенных конъюгатов составлял от $114 \pm 1,7$ до 130 ± 3 нм, концентрация железа — $2,63-3,01 \pm 0,09$ мг/мл. Наличие отрицательного заряда способствовало сохранению коллоидной стабильности растворов. Было показано специфическое взаимодействие конъюгатов с соответствующими антигенами на поверхности микобактерий и опухолевых клеток. Таким образом, полученная панель мишенных конъюгатов может быть рекомендована для использования в прижизненной диагностике Тб и опухолей головного мозга. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00240.

Литература:

1. Neuberger, T. J. Magn. Mater. 2005. V 293. P. 483.

РАЗРАБОТКА РЕПОРТЕРНОЙ КЛЕТочНОЙ ЛИНИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНСУЛИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

А.П. Федоровский¹, М.Н. Карагяур², К.Ю. Кулебякин^{1,2}

¹ Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

e-mail: fedorovskyar@mail.ru

Ключевые слова: инсулиновая сигнализация, мезенхимные стромальные клетки.

Согласно данным ВОЗ за последние 40 лет заболеваемость сахарным диабетом (СД) возросла в 4 раза. В 2019 году СД стал девятой причиной смерти в мире, в этом году из-за данного заболевания умерло приблизительно 1,5 миллиона человек. СД является одной из самых распространённых причин почечной недостаточности, инсульта, атеросклероза, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, слепоты. Инсулинорезистентность (ИР), являющаяся фактором развития СД 2 типа, также способствует канцерогенезу, ожирению, различным сердечно-сосудистым патологиям. На данный момент механизмы возникновения ИР полностью не выяснены. Учитывая фундаментальное значение ИР в этиологии многих заболеваний, задача раскрытия механизмов возникновения ИР имеет важное значение для медицины.

Целью исследования является создание модели для изучения инсулиновой чувствительности клеток в реальном времени.

Тирозинкиназа Брутона (ВТК) — нерецепторная тирозинкиназа, принимающая участие в созревании и функционировании В-лимфоцитов. В состав ВТК входит домен плекстриновой гомологии (PH-домен), имеющий сродство к фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфату (PIP3). PIP3, продуцируемый PI3K, является важным интермедиатом инсулинового сигнального каскада. ВТК не влияет на чувствительность клеток к инсулину и на дифференцировочный потенциал мезенхимных стромальных клеток (МСК). Это обстоятельство

позволяет использовать ВТК в качестве сенсора инсулиновой сигнализации для МСК.

С помощью генно-инженерных методов мы создали плазмиду, содержащую ген ВТК-GFP. Правильность нуклеотидной последовательности плазмиды была подтверждена секвенированием. Затем была проведена трансдукция иммортализованных МСК (hTERT МСК) с помощью лентивирусных частиц, содержащих целевую плазмиду. В «состоянии покоя» наблюдается равномерное свечение цитоплазмы клетки. При развитии инсулинового сигнального каскада ВТК-GFP связывается с образующимся PIP3, закоряваясь в примембранном пространстве. Вследствие этого после стимуляции клеток инсулином флуоресценция в реальном времени наблюдается преимущественно в области, прилегающей к клеточной мембране. Видимые различия во флуоресцентной картине между «состоянием покоя» и состоянием стимуляции инсулином позволяют говорить о том, что ВТК-GFP является перспективным сенсором инсулиновой чувствительности. Подобная модель является незаменимым инструментом для изучения механизмов развития ИР и поисков способов её коррекции. Работа выполнена при поддержке РФФИ (Грант № 20-015-00508, Клеточные механизмы регуляции гормональной чувствительности и дифференцировки стволовых клеток, роль регуляторных субпопуляций).

МИКРОФЛЮИДНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ IN VITRO

А.Ю. Федотов¹, О.В. Баранов¹, В.С. Комлев¹, С.А. Мирахмедова², И.А. Золотухин²

¹ ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: Fedotov_AYu@gmail.com

Ключевые слова: микрофлюидные устройства, эндотелий, регенерация, веноспецифическое воспаление.

Одним из заболеваний сосудистой системы, связанным со значительной нагрузкой на систему здравоохранения, является варикозная болезнь нижних конечностей. Ее распространенность очень высока, среди взрослого населения в Российской Федерации она достигает 30%. При отсутствии своевременной помощи или недостаточной медицинской активности населения варикозная болезнь приводит к развитию тяжелых инвалидизирующих осложнений, включая трофические язвы и тромбофлебит. В основе развития варикозной трансформации подкожных вен лежит ремоделирование венозной стенки в результате так называемого веноспецифического воспаления. Под последним понимаются комплекс молекулярно-клеточных взаимодействий, приводящих к структурной перестройке гладкомышечных клеток и внеклеточного матрикса. В патологическом процессе активное участие принимает эндотелий венозных сосудов, продуцирующий целый ряд субстанций, обеспечивающих рекрутинг лейкоцитов в венозную стенку. Изучение веноспецифического воспаления в настоящее время затруднено, поскольку требует проведения экспериментальных исследований на животных или клинических исследований с участием пациентов, что сложно в административном, этическом и финансово-экономическом аспектах. Одним

из решений может стать создание модели венозного эндотелия *in vitro* с помощью микрофлюидных устройств.

Работа направлена на создание прототипа микрофлюидного устройства для изучения процессов, лежащих в основе веноспецифического воспаления. Получены первые образцы микрофлюидных многоканальных устройств. Микрочип включает 5 каналов, которые могут быть в разных сочетаниях использованы для заселения клетками эндотелия. Каналы, в которые заселяют клетки, заполняют раствором коллагена или фибрином, а затем промывают. Тем самым создается поверхность, на которой клетки распластаются. Затем смежные каналы заполняются коллагеном или фибрином, после полимеризации которых в оставшиеся каналы заселяют клетки и заполняют питательной средой. Ее циркуляция осуществляется с помощью системы микронасосов. Для заселения использовали культуру эндотелиальных клеток пуповины человека. После серии экспериментов удалось добиться размножения и распространения клеток в канале с выстилкой поверхности канала по типу эндотелия. Длительность периода сохранения клеток жизнеспособными к настоящему времени составляет до 7 суток и может быть увеличена. Данное микрофлюидное устройство позволяет моделировать выстилку эндотелием сосудов. Устройство может быть использовано для анализа экспрессии молекул, участвующих в процессе ремоделирования при варикозной болезни. Доступ к электронной базе данных научных публикаций получен в рамках государственного задания № 075-00746-19-00.

РАЗРАБОТКА ТКАНЕВЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ И ТРОФИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

В.Э. Фетисова¹, А.Ю. Тетерина¹, В.С. Комлев¹

¹ ФГБУ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

e-mail: victoria.phetisova@yandex.ru

Ключевые слова: альгинат натрия, тканевые эквиваленты, биополимеры, биоматериалы, антибактериальные препараты, плазма крови.

В последние десятилетия активно развивается область материаловедения, связанная с разработкой и применением материалов медико-биологического назначения. Такие материалы могут быть использованы как основа имплантатов, шовные материалы, композиты и пр. Данная работа посвящена созданию новых материалов на основе биосовместимого полисахарида альгината натрия для замещения и регенерации кожных покровов. Альгинат натрия обладает рядом характеристик, которые позволяют использовать его для тканевой инженерии: биологическая совместимость с организмом человека [1, 2], биорезорбирование, возможность формирования прочных пористых каркасов [3], отсутствие риска передачи инфекций от животных [4].

Для эффективного замещения кожных покровов требуется модель, которая будет способна имитировать функции кожи. По этой причине в данной работе был разработан подход по созданию двухслойных тканевых эквивалентов. В таком случае нижний пористый слой воспроизводит функции дермы, верхний пленочный — эпидермиса.

В лечении трофических и диабетических поражений кожных покровов существует ряд сложностей, связанных

с тем, что организм человека имеет низкий регенеративный потенциал. Это ведёт к высокой вероятности отторжения используемых материалов и острой потребности использования антибактериальных препаратов. Для решения этих проблем в данном исследовании шла работа в двух направлениях: разработка подходов функционализации нижнего пористого слоя матрикса антибактериальными препаратами и факторами роста. В качестве антибактериальных препаратов были использованы ванкомицин, цефотаксим, гентамицин и линкомицин в концентрациях 50 мг/мл. Как факторы роста была использована плазма крови обогащённая и обеднённая тромбоцитами в концентрациях от 5 до 25% масс. Работа выполнена в рамках реализации гранта Президента РФ МК-4573.2022.1.3.

Литература:

1. Семенова Е.В., Билименко А.С., Чеботок В.В. Современные проблемы науки и образования. 2019. № 5. С. 118.
2. Zhai Z., Xu K., Mei L. et al. Soft matter. 2019. V. 15. № 42. P. 8603.
3. Teterina A. Yu., Solovieva E.V., Baranov O.V. et al. J. of Physics: Conference series. V. 1347. № 1. P. 012076.
4. Chiara O., Cimbanassi S., Bellanova G. et al. J. BCM Surgery. 2018. V. 18. № 1. P. 1.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 *IN VITRO*

И.Ю. Филин, К.В. Китаева, А.В. Городилова, Ю.П. Маясин, Ч.Б. Харисова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов

Казанский Федеральный (Приволжский) Университет, Казань, Россия

e-mail: filin.ivy@gmail.com

Ключевые слова: иммунотерапия, онкология, мембранные везикулы, вакцины, цитохалазин В, IL-2.

Мембранные везикулы, индуцированные цитохалазином В (иМВ), представляют собой мембраносвязанные структуры различного размера, содержащие белки, липиды, ядерные и митохондриальные компоненты. иМВ способны сливаться с реципиентными клетками посредством эндоцитоза. Следовательно, иМВ из опухолевых клеток можно использовать для представления опухолевых специфических антигенов клеткам иммунной системы. Целью настоящей работы был анализ взаимодействия иМВ, выделенных из клеток меланомы и карциномы толстой кишки человека, с мононуклеарными клетками периферической крови человека (МКПК) *in vitro*.

Генетическая модификация клеток меланомы человека М14 и колоректального рака человека НСТ-116 были проведены с использованием рекомбинантных лентивирусов второго поколения LV-IL-2 для получения стабильных клеточных линий со сверхэкспрессией IL-2. иМВ были получены из нативных и генетически модифицированных опухолевых клеток человека. МКПК выделяли центрифугированием в градиенте фиколла (1077 г/см³). После этого иМВ добавляли к МКПК в концентрации 200 мкг/мл и инкубировали в течение 3 суток. МКПК без добавления иМВ использовали в качестве контроля. После чего МКПК окрашивали следующими антителами к CD3, CD4, CD8a, CD38, CD25, CD56, CD107a, CD127,

HLA-DR, CCR6, CXCR3, содержащими флуоресцентную метку. Результаты анализировали методом проточной цитометрии. Взаимодействие иМВ и МКПК исследовали с помощью лазерной конфокальной микроскопии и проточной цитометрии.

Нами показано, что иМВ нативных клеток М14 и НСТ-116, окрашенных флуоресцентным красителем, способны сливаться с Т-лимфоцитами в ко-культуре, что приводит к их активному взаимодействию и обмену компонентами цитоплазматической мембраны. Отмечена разница между контрольными Т-клетками без добавления иМВ и Т-клетками, культивируемыми с иМВ, на 4%. Но разница в популяции гранулоцитов была выше — 32%. Это можно объяснить способностью нейтрофилов к фагоцитозу. Также с помощью проточной цитометрии показано, что добавление иМВ клеток НСТ-116 и М14 в концентрации 200 мкг/мл увеличивает количество Т-киллеров на 12% и 9,6% по сравнению с контролем. Также отмечено увеличение Т-хелперов 2 на 7% и 10%, соответственно.

Таким образом, благодаря способности презентировать опухоль-специфические антигены клеткам иммунной системы и возможности активации противоопухолевого иммунного ответа, иМВ опухолевых клеток являются перспективным объектом для разработки терапевтических противоопухолевых вакцин. Однако необходимы дальнейшие исследования в этой области для изучения механизмов взаимодействия иМВ с иммунными клетками и возможных путей модуляции иммунного ответа. Данное исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет гранта Российского научного фонда 22-24-20018.

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ СИГНАЛЫ БИПОЛУШАРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ОБРАТИМОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

**И.Б. Филиппенков¹, Ю.А. Ремизова¹,
И.В. Мозговой¹, К.Д. Головина¹,
В.В. Ставчанский¹, А.Е. Денисова², Л.В. Губский^{2,3},
С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹**

¹ ФГБУ Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра
Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный
исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва,
Россия

³ ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий
ФМБА, Москва, Россия

e-mail: filippenkov@img.msk.ru

Ключевые слова: ишемический инсульт, tMCAO, ипсилатеральное полушарие мозга, контралатеральное полушарие мозга, транскриптомика, мРНК, микроРНК, регуляторные РНК.

Ишемический инсульт является одним из наиболее тяжелых многофакторных заболеваний мозга. Широкий спектр высокопроизводительных геномных и постгеномных технологий, а также модельных систем дает возможность уже сегодня получать данные, позволяющие формировать эффективные подходы к преодолению проблем, связанных с инсультом.

В течение длительного времени считалось, что фокальный инсульт может вызывать повреждения ткани мозга только в границах ипсилатерального полушария (ИП), в котором локализован очаг ишемии. Однако было показано, что в мозге также имеют место процессы (распространяющаяся депрессия/деполяризация, трансполушарный диализ), обеспечивающие протекание латентных реакций в контралатеральном полушарии (КП) [1–3]. Характер изменений в КП после фокального инсульта в настоящее время активно изучается. В частности, значительный интерес представляют исследования особенностей геномных реакций в клетках этой зоны мозга, в том числе, для понимания возможного регенеративного потенциала мозговой ткани в преодолении последствий инсульта.

В данной работе в условиях экспериментальной модели обратимой церебральной ишемии (tMCAO), выполненной под контролем магнитно-резонансной томографии (МРТ), был проведен полногеномный RNA-Seq анализ профилей 17367 генов (мРНК) и 765 микроРНК в симметричных участках мозга крыс ИП и КП через 24 часа после tMCAO. Нами была выявлена значительная модуляция активности генома не только в ИП, содержащем гиперинтенсивный МРТ-сигнал ишемического поражения, но и в КП, в котором подобные МРТ-сигналы не детектировались. Были охарактеризованы связанные с активностью мРНК и микроРНК метаболические системы, презентирющие процессы повреждения и восстановления неврологических функций, в том числе, в КП мозга. В результате мы выявили транскриптомные сигналы биполушарных изменений в головном мозге у модельных животных после фокальной церебральной ишемии-реперфузии. Мы полагаем, что установление функциональных взаимодействий на уровне кодирующих и регуляторных РНК может обеспечить следующий уровень понимания процессов повреждения и регенерации при инсульте. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 21-34-70048.

Литература:

1. Ruan L., Wang Y., Chen S.-C. et al. Neural Regen Res. 2017. V. 12. № 6. P. 931–7.
2. Abe O., Okubo T., Hayashi N. et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2000. V. 20. № 4. P. 726–35.
3. Hartings J.A., York J., Carroll C.P. et al. Brain. 2017. V. 140. № 10. P. 2673–90.

ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ТРОЙНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ P(D,L)LA-PEG-P(D,L)LA КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ БИМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

**Ю.С. Фомина¹, Ю.Д. Загоскин¹,
С.Н. Чвалун^{1,2}, Т.Е. Григорьев¹**

¹ ФГБУ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия
² ФГБУН Институт синтетических полимерных
материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва,
Россия

e-mail: ledy_uylia-98@mail.ru

Ключевые слова: гидрогели, амфифильные блок-сополимеры, полилактид, полиэтиленгликоль, самоорганизация.

Гидрогели, как класс материалов, зарекомендовали себя еще в 60-х годах прошлого века в качестве перспективных изделий биомедицинского назначения. Такие

коллоидные системы содержат большое количество воды в качестве дисперсионной среды, а их основой является трехмерная матрица высокомолекулярного соединения. Применение в качестве такой матрицы биоразлагаемых и биосовместимых амфифильных блок-сополимеров полилактида (PLA) и полиэтиленгликоля (PEG) открывает возможности в использовании гидрогелей в области тканевой инженерии и адресной доставки лекарств. За счет амфифильной природы гидрогелевой сетки возможно импрегнировать лекарственные препараты внутрь матрицы с целью использования материалов в качестве средств доставки пролонгированного действия. В то же время биосовместимость и механическая схожесть гидрогелей с нативными тканями, позволяет рассматривать их как перспективные материалы в области регенеративной медицины. Однако известные из литературы модули упругости таких систем, как правило, невысоки (1–10 кПа) [1], что сужает круг их возможного применения.

В работе была синтезирована серия тройных блок-сополимеров P(D,L)LA-PEG-P(D,L)LA с различным соотношением гидрофильного и гидрофобного блоков (1:1,5, 1:1, 1:0,5), на основе которых были получены гидрогелевые материалы. Гидрогели были получены заменой растворителя: блок-сополимеры растворяли в «хорошем» для обоих блоков растворителе (1,4 — диоксан), а далее постепенно заменяли на «плохой» растворитель для полилактидного блока (воду). Вследствие агрегации гидрофобного блока и за счет образования проходных цепей полиэтиленгликоля проходило гелеобразование. Наноструктура гидрогелей была исследована методом малоуглового рентгеновского рассеяния. На основе полученных зависимостей были рассчитаны межплоскостные расстояния. Установлено, что с уменьшением длины гидрофобного блока происходит уменьшение межплоскостных расстояний. Физико-механические характеристики материалов были изучены методом механического анализа. Для полученных гидрогелей были достигнуты модули упругости до 45 кПа, о чем ранее не сообщалось в научной литературе для данных систем. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Литература:

1. Basu A. et al. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2016. V. 107. P. 192.

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПОДВИЖНОСТИ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС ПРИ ТРАВМАХ СПИННОГО МОЗГА

Г.А. Фурса¹, С.С. Андрецова¹, О.В. Степанова¹, А.В. Чадин¹, А.Д. Воронова¹, Е.К. Карсунцева¹, А.С. Семкина^{1,2}, А.О. Сосновцева¹, И.В. Решетов³, В.П. Чехонин^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

³ УКБ № 1 ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

e-mail: gregorii.fursa@gmail.com

Ключевые слова: ростовой фактор головного мозга; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; хроническая травма спинного мозга; клеточная терапия; регенеративная медицина.

Повреждения спинного мозга являются причиной хронической травмы и формирования кисты, которая сдавливает спинной мозг, препятствуя проведению нервных импульсов и нейрогенерации. Клеточная терапия — перспективная стратегия для лечения посттравматических кист спинного мозга. Важную роль в регенерации нервной ткани после повреждения играют нейротрофические факторы. Так в ряде исследований была показана роль ростового фактора головного мозга (BDNF) в терапии травм спинного мозга [1]. Наиболее простым является введение BDNF в сочетании с клетками. Однако, экзогенные ростовые факторы быстро деградируют после введения в область травмы, поэтому исследуется способы доставки нейротрофинов с помощью аденовекторов, которые будут секретировать факторы в области повреждения [2]. Целью данной работы является изучение применения нейротрофического фактора мозга для улучшения подвижности задних конечностей крыс при травмах спинного мозга.

Для создания клеточной культуры из образцов ткани крысы и человека использовали протоколы, разработанные ранее в нашем отделе [3]. При приготовлении трансплантата 750 тысяч клеток комбинировали с 500 нг BDNF. Для доставки BDNF с помощью аденовекторов, ранее полученные клетки в количестве 750 тысяч или 1,5 миллиона, трансдуцировали аденовектором, содержащим зрелую форму ростового фактора головного мозга по ранее разработанному протоколу [4]. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после экспериментальной травмы спинного мозга крыс. Трансплантацию 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.

В результате было показано, что введение клеток в сочетании с нейротрофическим фактором мозга усиливает терапевтическую эффективность обкладочных клеток при хронической травме спинного мозга с несформированной кистой. При использовании аденовектора секретирующего BDNF, было показано, что трансдукция обкладочных клеток не усиливает эффект от их трансплантации. Возможно, BDNF является не лучшей терапевтической молекулой для лечения травм спинного мозга. Именно обкладочные клетки, показавшие свою эффективность в терапии повреждений спинного мозга, являются аутологичными и могут быть в дальнейшем использованы в персонализированной медицине. Работа выполнена при поддержке государственного задания № 056-00017-20-00 от 25.12.2019 г.

Литература:

1. Li X. et al. *Spinal Cord*. 2019. T. 57. № 1. С. 65–74.
2. Betz V.M. et al. *Acta Neurochirurgica*. 2016. T. 158. № 2. С. 367–378.
3. Stepanova O.V. et al. *Stem Cells and Development*. 2019. T. 28. № 18. С. 1253–1263.
4. Karsuntseva, E.K. et al. *Bull Exp Biol Med* 2022 № 172, С. 617–621.

РЕАКТИВАЦИЯ МУТАНТНОГО ОНКОСУПРЕССОРА p53 ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОБЕНЗОТИАЗОЛА

Р.Р. Хадиуллина¹, Д.Р. Давлетшин¹,
Э.М. Хусаинова¹, Р.М. Миргаязова¹,
В.В. Часов¹, М. Бауд², Э.Р. Булатов¹

¹ Казанский федеральный университет, Казань,
Россия

² Университет Саутгемптона, Саутгемптон,
Великобритания

e-mail: nazyrovarania@gmail.com

Ключевые слова: p53, транскрипционный фактор, мутантный p53, опухолевые клетки, низкомолекулярные модуляторы.

Белок p53 представляет собой транскрипционный фактор, который сохраняет целостность генома, активируя нижестоящие гены, белковые продукты которых участвуют в остановке клеточного цикла, апоптозе и репарации ДНК. Ген TP53 является одним из наиболее часто мутированных генов при онкологических заболеваниях человека [1]. Наличие мутации приводит к дестабилизации третичной структуры p53 и, как следствие, к потере его транскрипционной активности. Реактивация мутантного p53 с помощью низкомолекулярных соединений имеет хорошие перспективы в качестве терапевтической стратегии для лечения большого числа опухолей человека [2].

В данной работе мы оценили цитотоксическое действие производных аминобензотиазола на клеточную линию фибробластов кожи человека (HSF) и клеточные линии аденокарциномы человека с различным статусом p53 (дикий тип: A549p53(wt); мутантный: MIAPaCa-2p53(R248W) и OVCAR-3p53(R248Q); нокаут: MCF7 p53(-/-)) при концентрациях 2,5–120 мкМ в течение 48 часов методом MTS-теста. Далее мы идентифицировали изменения экспрессии генов сигнального пути p53, индуцированные производными аминобензотиазола, с помощью методов ПЦР в реальном времени и вестерн блот анализа.

Было продемонстрировано наличие дозозависимого цитотоксического эффекта соединений на всех клеточных линиях. Однако действие соединений было более выражено по отношению к опухолевым клеткам в сравнении с нормальными клетками. Также опухолевые клетки с p53 дикого типа и с нокаутом p53 были менее чувствительны, чем клетки с мутантным p53. Кроме того, соединения повышали уровень экспрессии генов-мишеней белка p53 в опухолевых клетках с мутантным p53, в то время как в клеточной линии с p53 дикого типа существенных модулирующих эффектов не наблюдалось.

Полученные в рамках исследования результаты позволяют более детально понять молекулярные механизмы реактивации различных форм мутантного p53, что, в свою очередь, имеет решающее значение для обеспечения эффективного внедрения низкомолекулярных активаторов мутантного p53 в клиническую практику. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-24-20034.

Литература:

1. Levine A.J. Journal of Molecular Cell Biology. 2019. V. 11, № 7. P. 524.
2. Chasov V., Mirgayazova R., Zmievskaia E. et al. Frontiers in Oncology. 2020. V. 10. P. 1460.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ «НЕОБНОВЛЯЕМЫХ» КЛЕТОЧНЫХ ЗОН

А.В. Халявкин

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
РАН, Москва, Россия
ФИЦ Информатика и управление РАН, Москва,
Россия

e-mail: antisenesesc@mail.ru

Ключевые слова: физиологическая регенерация, обратимость, нейроны головного мозга, фолликулы яичника, обновление клеток.

Считается, что в ряде органов и тканей есть зоны, в которых клеточного обновления не происходит. К клеткам таких зон относят, напр., нейроны головного мозга, фолликулы яичников и др. Поэтому полагают, что и естественная убыль нейронов, и их возрастные изменения повышают уязвимость организма и вносят вклад в старение. А то и являются его основной причиной. Возрастные же изменения «дремлющих» в фолликулах яйцеклеток и истощение их пула, заложенного в раннем онтогенезе, считается основной причиной снижения фертильности с возрастом.

Однако у нейронов головного мозга и у фолликулов яичников есть стволовые клетки-предшественники [1, 2]. Они, как и все стволовые клетки, не имеют ограничений на размножение (лимита Хейфлика) и способны эффективно обновлять эти, как считается, необновляемые компартменты. А возрастное снижение их клеточности никак не связано с их «необновляемостью». Потому что аналогичное сокращение клеточного состава (цитопения) происходит и в постоянно обновляемых компартментах организма — эпидермисе, костном мозге и др. Причем эти изменения оказываются обратимыми [3].

Данные результаты и некоторые другие свидетельства показывают, что первопричина подобной системной возрастной цитопении не связана с принципиальной неспособностью клеточных компартментов организма к самоподдержанию и самовосстановлению. Скорее всего, она является следствием дисрегуляции ряда процессов в условиях жизнедеятельности стареющего организма [4].

Именно поэтому наблюдается возрастное угасание потенциала физиологической и репаративной регенерации. Ряд данных свидетельствует о том, что это угасание регулируемо и поддается корректировке [3, 4].

Литература:

1. Ahlenius H., Visan V., Kokaia. M, et al. J. Neurosci. 2009. V. 29. P. 4408.
2. Woods D.S., Tilly J.L. Semin. Reprod. Med. 2013. V. 31. P. 24.
3. Rando T.A., Chang. Cell 2012. V. 148. P. 46.
4. Khalyavkin A.V., Krut'ko V.N. Biogerontology 2018. V. 19. P. 101.

ЭНДОТЕЛИЗАЦИЯ СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА В УСЛОВИЯХ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА

М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева,
Т.В. Глушкова, Л.В. Антонова

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний, Кемерово, Россия

e-mail: khanovam@gmail.com

Ключевые слова: тканевая инженерия, тканеинженерный сосудистый протез, аутологичные эндотелиальные клетки, перфузионный биореактор.

Дефицит донорских аутологичных трансплантатов породил интерес к разработке сосудистых протезов. Одним из факторов несостоятельности сосудистых протезов малого диаметра является их острая критичная тромбогенность [1]. Создание протеза с готовым к моменту имплантации эндотелиальным монослоем может повысить его тромборезистентные свойства [2].

Методом электроспиннинга были изготовлены трубчатые каркасы из смеси биodeградируемых полимеров — поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактона). Фибриновое покрытие на внутренней поверхности протеза выполнено с применением тромбина и CaCl₂. Культуру аутологичных колониформирующих эндотелиальных клеток получали от пациентов с ишемической болезнью сердца и заселяли в количестве 700 тыс./мл в полной питательной среде EGM-2MV. Клеточнозаселенный сосудистый протез подключали к системе пульсирующего биореактора с напряжением сдвига 2,85 дин/см² в течение 5 суток. Для контроля аналогичные образцы культивировали в статических условиях. Эффективность эндотелизации анализировали с помощью иммунофлуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии. Для количественного анализа снимков использовали ImageJ.

Анализ жизнеспособности эндотелиоцитов продемонстрировал полную ее сохранность независимо от условий культивирования клеток. Плотность клеточной популяции также статистически значимо не различалась ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии пагубного влияния выбранного режима на целостность эндотелиальной выстилки. В условиях пульсирующего потока в 1,5 раза увеличилась продукция эндотелиальными клетками структурного белка F-актина и белка точечной адгезии Талина ($p < 0,05$). Хаотичная ориентация микрофиламентов цитоскелета под влиянием потока сменилась на преимущественную ориентацию в направлении потока. В условиях пульсирующего потока выявлено увеличение экспрессии специфических эндотелиальных маркеров CD31, CD309 — в 1,5 раза, синтеза внутриклеточного vWF — в 3 раза ($p < 0,05$).

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

Литература:

1. Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C. et al. Bioengineering. 2020. V. 7. № 4. P. 160.
2. Jana S. Acta Biomater. 2019. V. 99. № 53. P. 71.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ НА МАТРИЦАХ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ УМЕРЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Ю.П. Харская, Е.В. Зубарева, Н.С. Босенко, С.В. Надеждин, К.С. Бояршин

ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

e-mail: zubareva@bsu.edu.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, постоянное магнитное поле, хитозан, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа.

В настоящее время существует острая необходимость в разработке инновационных технологий, способствующих повышению эффективности методов восстановительного лечения пациентов. Перспективным направлением является конструирование и выращивание вне организма функциональных тканей на основе биосовместимых, биodeградируемых матриц в сочетании с мезенхимными стволовыми клетками (МСК) [1, 2]. Особый интерес представляет изучение влияния статического магнитного поля (СМП) и скаффолдов, обладающих магнитными свойствами [3, 4], на процессы формирования тканеинженерных конструкций.

Цель работы: изучение особенностей изменения метаболической активности МСК при культивировании на различных субстратах в условиях действия постоянного магнитного поля.

В качестве скаффолдов использовали хитозановые волокна, изготовленные методом мокрого прядения [5], имеющие в своем составе суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, и волокна из хитозана, не обладающие магнитными свойствами. Культивирование МСК на скаффолдах осуществляли в течение 72 часов в условиях CO₂-инкубатора в присутствии и в отсутствие постоянного магнитного поля умеренной интенсивности (80 мТл). По окончании времени инкубации выполняли исследование метаболической активности МСК с использованием МТТ-теста.

Выявлено, что включение в состав матриц суперпарамагнитных материалов не оказывает значимого влияния на метаболическую активность МСК по сравнению с клетками, культивированными на матрицах из соответствующего материала без наночастиц оксида железа.

Установлено, что постоянное магнитное поле умеренной интенсивности опосредует стимуляцию метаболической активности МСК независимо от субстрата, используемого для культивирования клеток, о чем свидетельствует повышение жизнеспособности МСК на 32% при культивировании на хитозановых волокнах, на 40% при использовании в качестве матрицы хитозановых волокон с суперпарамагнитными наночастицами оксида железа.

Литература:

1. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. Stem Cells. 2019. V. 37. P. 855–864.
2. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Science. 1999. V. 284. P. 143–147.
3. Marycz K., Kornicka K., Röcken M. Stem Cell Rev. 2018. V. 14. P. 785–792.
4. Yun H.M., Ahn S.J., Park K.R. et al. Biomaterials. 2016. V. 85. P. 88–98.
5. Brüggemann D., Michel J., Suter N. et al. Beilstein J. Nanotechnol. 2020. V. 11. P. 991–999.

ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА ЭФР НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.В. Харченко¹, Р.С. Каменцева¹,
Е.С. Корнилова^{1,2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: mariannakharchenko@gmail.com

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, рецептор эпидермального фактора роста, дифференцировка, пролиферация, EGF, TGF- α , AREG, Hupер.

Общепринятые представления о передаче сигнала и эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) получены при исследовании постоянных линий трансформированных клеток эпителиального происхождения (например, линий HeLa и A549), обладающих повышенной экспрессией рецептора. Однако, по нашим данным, повышенная экспрессия EGFR наблюдается также и в эндометриальных мезенхимных стромальных клетках (энМСК) человека, а также в МСК других типов. Поскольку МСК можно рассматривать как модель нормальных клеток в культуре, актуальной задачей является изучение роли сигнальной системы, опосредуемой EGFR, в регуляции функционирования этих клеток. Известно, что сигналы EGFR стимулируются его лигандами, различающимися, в частности, по аффинности к рецептору. Так, в отличие от EGF и TGF- α , низкоаффинный лиганд амфирегулин (AREG) не вызывает интернализацию EGFR как в энМСК, так и в HeLa. Также обнаружено, что AREG не влияет на пролиферацию в энМСК, тогда как EGF и TGF- α ее ускоряют. Опухолевые клетки, напротив, быстрее пролиферируют в присутствии AREG. Методом проточной цитометрии мы оценили концентрацию пероксида водорода в цитоплазме клеток HeLa и энМСК, которые были трансфекцированы лентивирусами, несущими ген сенсора к H₂O₂ — белка Hupер. Образование H₂O₂ в ходе эндоцитоза связано с активацией NADPH-оксидазы на мембранах эндосом и лизосом. Повышение цитоплазматической концентрации H₂O₂ приводит к увеличению интенсивности эмиссии Hupер при его возбуждении монохроматическим излучением 488 нм и к уменьшению — при возбуждении световой волной 405 нм. Hupер-ratio (F488/F405) прямо пропорционально концентрации H₂O₂. Так, в суспензионных пробах клеток линии HeLa, к которым был добавлен EGF, Hupер ratio оказался выше, чем в контрольных, уже через 10 мин после добавления фактора роста и продолжает увеличиваться, выходя на плато после 30 мин. В то же время, добавление EGF в энМСК не отразилось на Hupер ratio. Инкубация энМСК с 8-Br-cAMP и прогестероном приводила к стимуляции децидуальной дифференцировки клеток. Однако, добавление EGF и TGF- α одновременно с 8-Br-cAMP и прогестероном препятствует стимуляции децидуальной дифференцировки, причем этот эффект опосредуется EGFR-зависимыми сигнальными путями, поскольку блокируется AG1478 — ингибитором тирозинкиназной активности EGFR. Кроме того, AG1478 значительно повышает секрецию IGFBP1 даже при дифференцировке в отсутствие лигандов EGFR. В отличие от первых двух лигандов, AREG не препятствовал дифференцировке. Мы предполагаем, что эффект EGF и TGF- α регулируется на уровне эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов, подавляя дифференцировку

на пролиферативной стадии цикла, в то время как AREG функционирует на секреторной стадии. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00927.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ РЕПЕРТУАРА ГИСТОНОВ 1

И.А. Хворова¹, Е.А. Репкин², Д.А. Переплетчикова¹,
Д.А. Костина¹, А.Б. Малашичева¹, А.А. Лобов¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: irina.khvorova99@gmail.com

Ключевые слова: Notch, гистон 1, эндотелий, HUVEC, гистоновый код, эпигеном, секретом, напряжение сдвига.

Эндотелий, выстилающий стенки сосудов и капилляров, играет ключевую роль в функционировании сердечно-сосудистой системы и передачи сигналов из кровотока в подлежащие ткани. Нарушения функции эндотелия, эндотелиальная дисфункция, связана с широким спектром заболеваний и восстановление функции эндотелия — это перспективная терапевтическая мишень [1].

Известно, что поддержание базового уровня активации сигнального пути Notch в эндотелии необходимо для поддержания эндотелиального фенотипа, а дисрегуляция Notch связана с эндотелиальной дисфункцией [2]. Сигнальный путь Notch имеет дозозависимый эффект [3], и мы предполагаем, что длительная гиперактивация этого сигнального пути может приводить к накоплению эпигенетических изменений, которые значительно повышают риски развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели анализ пост-трансляционных модификаций гистонов и изменений секретомного профиля эндотелиальных клеток в ответ на активацию сигнального пути Notch. Активацию Notch проводили при помощи лентивирусной трансдукции эндотелиальных клеток пупочного канатика человека (HUVEC) конструкцией для сверхэкспрессии внутриклеточного домена NOTCH1 (N1ICD). После трансдукции N1ICD или контрольной конструкцией, проводили сбор секретомы и выделение гистонов, после чего образцы анализировали при помощи протеомики-дробовика на платформе TimsToF Pro (Bruker).

Активация сигнального пути Notch приводила к понижению уровнях PTX3, SERPINE1 и THBS1 в секретоме эндотелиальных клеток. Секреция этих белков эндотелием играет важное значение в поддержании гомеостаза, и снижение их экспрессии под действием Notch хорошо согласуется с литературными данными о том, что дисрегуляция этого сигнального пути приводит к эндотелиальной дисфункции.

При анализе гистонов мы не нашли статистически достоверных различий в пост-трансляционных модификациях гистонов 2 и 3, однако выявили существенное изменение экспрессии нескольких гистонов 1 (H1). Активация сигнального пути Notch приводит к повышению экспрессии N-ацетилированных форм H1-0, H1-3, H1-4, H1-5, H1-10. Гистон 1 изучен меньше других гистонов, однако мы предполагаем, что как и в случае других гистонов, изменение репертуара гистонов 1 может быть связано с эпигенетической регуляцией экспрессии генов. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-14-00152.

Литература:

1. Theodoris C.V., Zhou P., Liu L. et al. Science. 2021. V. 371. P. eabd0724.
2. Fortini F., Vieceli Dalla Sega F., Marracino L. et al. Biomedicines. 2021. V. 9. P. 997.
3. Semenova D, Bogdanova M, Kostina A. et al. Cell Tissue Res. 2020. V. 379. P. 169.

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ТРАНСФЕКЦИИ ЗУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПЛАЗМИДНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ В СОСТАВЕ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТРИКСОВ

М.А. Хворостина^{1,2}, Т.Б. Бухарова¹, В.К. Попов²

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

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

e-mail: mariya.sya4ina@yandex.ru

Ключевые слова: ген-активированный матрикс, невирусная доставка генов, трансфекция, регенерация тканей.

Разработка трехмерных (3D) конструкций на основе биорезорбируемых полимеров с внедренными в них нуклеиновыми кислотами, кодирующими факторы роста, является наиболее перспективной стратегией для обеспечения эффективной регенерации пораженных участков ткани [1]. Ранее нами продемонстрирована принципиальная возможность формирования методом 3D криопечати универсальных систем на основе альгината натрия для локализованной доставки генетических конструкций в область дефекта [2].

В настоящей работе методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени исследована кинетика трансфекции НЕК293 при их инкубации с ген-активированными альгинатными матриксами разной степени сшивки и содержащими плазмиду с геном усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

Показано, что гидрогелевые матриксы способствуют эффективной трансфекции целевых клеток, обеспечивая сохранность и целостность высвобождающейся плазмидной конструкции. Увеличение степени сшивки приводит к уменьшению скорости трансфекции клеток. На 7 сутки плазмиды, высвободившиеся из матрикса, сшитого 2% раствором ионов кальция (Ca²⁺), проникли в 30±5 тыс. клеток, в то время как плазмиды из альгинатного матрикса, сшитого 10% раствором ионов кальция, проникли в 21±5 тыс. клеток. Это оказало непосредственное влияние на уровень экспрессии гена EGFP (для 2% Ca²⁺ он выше в 1,7 раз). Однако от степени сшивки также зависит полное время воздействия ген-активированных матриксов на клетки. Учитывая, что матриксы, сшитые 10% Ca²⁺, способствовали трансфекции клеток в течение более продолжительного времени (17 суток), по сравнению с матриксами, сшитыми 2% Ca²⁺ (7 суток) суммарное количество трансфицированных составило 53±6 тыс.кл. и 30±5 тыс. клеток, а уровень экспрессии гена закономерно увеличился в 2 раза при увеличении степени сшивки.

Таким образом, контролируя процесс полимеризации альгинатных матриксов, возможно влиять на кинетику трансфекции клеток, подбирая тем самым необходимые условия для более эффективной регенерации различных типов тканей. Работа выполнена при

поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части разработки процесса 3D криопечати гидрогелевых матриксов и работ по Государственному заданию ФГБНУ «МГНЦ» в части получения и характеристики плазмид.

Литература:

1. Laird N.Z. et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 2021. V. 174. PP. 613–627.
2. Khvorostina M.A. et al. Gels. 2022. V. 8. № 7. P. 421.

ФИЛОСОФСКИЕ ОСНОВАНИЯ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ ОТНОШЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ТЕХНОЛОГИЕЙ «ИСКУССТВЕННОЙ МАТКИ» (AWT)

С.А. Хмелевская

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

e-mail: xmelevsk@mail.ru

Ключевые слова: технология AWT; эктогенез; правовое регулирование; философские основания; эмбрион; эктогенетический субъект; правосубъектность.

Технология AWT («Artificial womb technology») активно разрабатывается в ряде научных центров [1]. Данная технология относится к эктогенезу, а жизнеспособный и развивающийся в искусственной утробе (экзомбе/ехо womb) человеческий эмбрион/плод получил название «эктогенетический субъект». При этом выделяют частичный (если эмбрион/плод развивался какое-то время в материнской/женской утробе, а затем был помещен в искусственную матку) и полный (развитие только в экзомбе) разновидности эктогенеза. Если первый из названных видов применяется в неонатологии уже сегодня (например, создание кувезов для недоношенных или заболевших новорожденных), то второй — в настоящее время находится еще на стадии научных исследований. Технология AWT в случае полного эктогенеза способна породить существенные изменения в понимании человеческой сущности, материнства, роли женщины в обществе, поэтому решение такого рода проблем требует их философского осмысления и, соответственно, определенных философских оснований для правового регулирования [2]. Перечислим некоторые из таких проблем:

1) уже сейчас технология AWT воспринимается в обществе неоднозначно: с одной стороны, она несет в себе благо (например, существенно продвигает развитие пренатальной медицины), но, с другой стороны, порождает многочисленные риски (например, связанные с возможными отклонениями в развитии ребенка, выращенного в экзомбе) [3]. Поэтому применение технологии AWT должно быть разрешено только по медицинским показаниям, а с правовой точки зрения ее использование можно отнести к ситуациям крайней необходимости;

2) задачи правового регулирования — не только упорядочить общественные отношения, связанные с AWT, но, в первую очередь, защитить права эмбриона/плода — эктогенетического субъекта, который развивается вне утробы матери, самостоятельно, что требует повышенных мер его правовой защиты. В связи с этим требуют пересмотра философские основания правосубъектности эктогенетического субъекта как субъекта «*sui generis*», а также переосмысление понятий «рождение ребенка», «уголовно-правовая защита эмбриона/плода». Необходимо ввести в правовое регулирование

дефиницию эктогенетического субъекта, закрепив его право на жизнь (презумпция его сохранения), а также ряд иных прав, например, на медицинскую помощь и пр.;

3) важно выстроить и систему ответственности за нормальное и стабильное развитие эмбриона/плода в экзомбе, закрепив права и обязанности родителей, медицинского учреждения. Требуется разработка правовой основы нахождения эмбриона/плода в экзомбе, особый режим защиты его прав. Развивающийся в экзомбе эмбрион/плод — это субъект *sui generis*, право на жизнь и здоровье которого должно охраняться нормами права на всех этапах его развития.

Литература:

1. Weijun Z., Zhenying Z., Yuchen Y. et al. Journal of Biomedical Engineering. Dec. 2021. Vol.38. No.6. P.1134–1143.
2. Khmelevskaya S.A. Russian Studies in Philosophy. 2020. V.58. № 1. P.34–43.
3. Segers S. BMC Med Ethics. 2021. V.22. <https://doi.org/10.1186/s12910-021-00630-6>.

РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ШЕЛКОВОЙ ОТВАРЕННОЙ МАРЛИ И АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ КОЖИ

**Н.В. Храмова¹, О.С. Чарышникова²,
Н.А. Циферова^{2,3}, Х. Алимова⁴, Х.Х. Умурзакова⁴**

¹ Ташкентский государственный стоматологический институт, Ташкент, Узбекистан

² Центр передовых технологий, Ташкент, Узбекистан

³ Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

⁴ Ташкентский институт текстильной и легкой промышленности, Ташкент, Узбекистан

e-mail: nhramova@mail.ru

Ключевые слова: раневые покрытия, дермальные фибробласты, тканеинженерные конструкции.

В наших предыдущих экспериментах было показано, что раневое покрытие «Отваренная шелковая медицинская марля» (ШММ) [1] обладает свойствами биосовместимости, не имеет цитотоксического эффекта и не снижает пролиферативную активность культивируемых дермальных фибробластов, что обуславливает перспективность дальнейших исследований, направленных на разработку тканеинженерных конструкций (ТИК) для регенеративной медицины [2] на его основе.

Данное исследование посвящено изучению эффективности заживления модельной раны размером 1×1 см у экспериментальных животных с использованием разработанной нами ТИК на основе ШММ, заселенной дермальными фибробластами новорожденных крыс. Моделирование раны у белых беспородных крыс проводили по. Эффективность ТИК оценивали по значимым клиническим параметрам заживления раны.

Оценка эффективности параметров заживления раны в контроле показала полное заживление на 16-е сутки, тогда как в группе с использованием ТИК полное заживление раны происходило на 14-е сутки. Морфологические исследования не обнаружили отличий от нативной кожи как в экспериментальной, так и в контрольной группах [3].

Таким образом, применение разработанной нами ТИК при лечении поверхностных дефектов кожи способствует

восстановлению кожного покрова за счет натурального фиброина в составе ШММ, выполняющего механическую и поддерживающую функцию для дермальных фибробластов, которые мигрируют в рану и ускоряют регенерацию кожи.

Авторы подтверждают, что не имеют конфликта интересов.

Литература:

1. Патент № 3186:2017 от 05.06.2017 г. Марля медицинская шелковая отваренная.
2. Чарышникова О.С., Храмова Н.В., Умурзакова Х.Х., Ахмедов Ж.А., Циферова Н.А. Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари. Республика илмий анжумани. 18 май, 2021 г. стр. 189
3. Храмова Н.В., Чарышникова О.С., Амануллаев Р.А., Хусанова Ю.Б. Журнал медицина и инновации. — Ташкент, 2021. — № 3. — С.175–180

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ — НЕРАЗРУШАЮЩИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИИ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Е.А. Храмова¹, О.Р. Куликова¹, Т.Е. Григорьев²

¹ Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

² НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

e-mail: alyonushk@gmail.com

Ключевые слова: акустическая микроскопия, регенеративная медицина, ультразвук, тканеинженерные конструкции, неразрушающий контроль.

С развитием регенеративной медицины и ее активным практическим применением острее встает вопрос о методах, предоставляющих количественные данные об образцах без их разрушения. Одновременно с этим прогресс в области химии полимеров позволяет дополнительно модифицировать матриксы в процессе их изготовления для получения новых механических и морфологических свойств у готового продукта. Ультразвуковая микроскопия имеет высокую чувствительность к изменению этих параметров и обладает рядом преимуществ для проведения медико-биологических исследований: проведение исследований в биологических средах, бесконтактность и неинвазивность, быстрое получение визуальных и количественных данных в режиме реального времени.

В работе представлен анализ прим. мости методов акустической микроскопии в регенеративной медицине для оценки тканеинженерных конструкций на разных этапах их подготовки перед интеграцией в живой организм.

На этапе разработки новых матриксов и выбора типов их формирования методами акустической микроскопии *in vitro* проведена первичная дефектоскопия образцов для выявления их однородности (массивные изделия, гидрогелевые и нетканые матриксы), сохранности заданных морфологических свойств (направление, диаметр и интеркалированность пор губчатых матриксов, направленность волокон в нетканых матриксах) и изменение упругих свойств в зависимости от количества фотоинициатора гелях и состава композитных матриксов.

На этапе прекондиционирования в биологических средах показано влияние состава кондиционирующей среды на скорость набухания гидрогелевых и губчатых матриксов. Установлено, каким образом заселение

матриц культурой клеток изменяет его геометрию и упругие свойства.

Исследования проведены на губчатых, нетканых, гидрогелевых и монолитных матрицах, полученных из коллагена, полиакриламида, полилактида, хитозана и его композитов. Работа выполнена на основе бюджетного финансирования в рамках темы № 1201253306, матрицы получены при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК CDNF КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО КОРРЕКЦИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

А.С. Цыбко, Д.В. Ерёмин, Н.В. Хоцкин, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: antoncybko@mail.ru

Ключевые слова: дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF); рекомбинантный белок; внутрижелудочковая инъекция; серотонин; ассоциативное обучение; тревожность; депрессивно-подобное поведение.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor; CDNF) традиционно считается защитным фактором для дофаминергических нейронов. В различных моделях болезни Паркинсона (БП) CDNF показал впечатляющие протективные и регенеративные свойства [1]. Однако всё ещё мало известно об участии CDNF в регуляции немоторного поведения и модуляции других нейротрансмиссивных систем [2], например, серотониновой (5-HT). Мы считаем, что CDNF имеет большой потенциал для коррекции различных поведенческих нарушений при нейродегенеративных расстройствах. Чтобы подтвердить это предположение, самцы мышей линии C57Bl/6J получили инъекцию рекомбинантного белка CDNF человека (3, 10, 30 мкг в левый боковой желудочек мозга) или PBS. Поведение в домашней клетке было оценено в течение трёх дней после инъекции в установке PhenoMaster. Тревожность, исследовательское и депрессивно-подобное поведение были оценены после центральной инъекции CDNF в дополнительный эксперименте.

CDNF во всех использованных дозах не повлиял на двигательную активность, потребление воды и пищи. Продолжительность сна в первые 24 часа тестирования была снижена после инъекции 3 мкг CDNF. С помощью модуля «оперантная стенка» было выявлено существенное улучшение ассоциативного обучения у животных, получивших CDNF во всех дозах. Инъекция 10 и 30 мкг CDNF оказала выраженный анксиолитический и антидепрессантный эффекты и усилила исследовательскую активность животных. CDNF во всех дозах существенно усилил обмен 5-HT в головном мозге мышей. Одновременно с этим, нами выявлены увеличение уровня мРНК генов, ответственных за рецепцию (Htr1a, Htr7) и катаболизм (Maoa) 5-HT, во фронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе животных, получивших инъекцию CDNF.

Таким образом, мы впервые показали, что центральная инъекция белка CDNF оказывает прокогнитивный, анксиолитический и антидепрессантный эффекты, которые могут быть связаны с усилением обмена 5-HT и увеличением экспрессии 5-HT рецепторов. Спектр выявленных эффектов делает CDNF привлекательным для коррекции поведенческих нарушений при таких

нейродегенеративных заболеваниях, как БП и болезнь Альцгеймера. Содержание животных было поддержано фундаментальным исследовательским проектом #FWNR-2022-0023. Исследование было поддержано Российским научным фондом, грант № 22-15-00011.

Литература:

1. Lindholm P., Saarna M. Mol. Psychiatry. 2022. V. 27. P. 1310–1321.
2. Ерёмин Д.В., Ильчибаева Т.В., Цыбко А.С. Биохимия. 2021. Т. 86. № 7. С. 1027–1042.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НА ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ МАТРИЦАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМИНОГРУППАМИ

А.С. Чабина¹, А.В. Лихачев², А.В. Нащекин², Д.А. Курдюков², Н.Д. Просалов², Ю.А. Нащекина¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: chabina-alina@yandex.ru

Ключевые слова: поликапролактон, химическая модификация, композитные матрицы, аминогруппа, мезенхимальные стромальные клетки.

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) является перспективным материалом для применения в регенеративной медицине, однако ввиду его гидрофобности и отсутствия поверхностных функциональных групп, полимеру требуются дополнительные модификации, так как указанные свойства препятствуют адгезии клеток [1].

Успешным методом модификации ПКЛ считается химическое введение аминогруппы путем взаимодействия с аргинином, так как одна аминогруппа будет обеспечивать связывание с поверхностью матрицы, а вторая создавать положительный поверхностный заряд [1].

Введение активных групп может происходить и за счет физического смешивания основного полимера и модифицирующего агента, например, создание композитных матриц на основе смеси ПКЛ с полиэтиленгликольдиамином (ПЭГ-2NH₂) [2].

Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния различных способов модификации матриц на основе ПКЛ на поведение мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

В работе были использованы матрицы, полученные методом полива, а также композитные матрицы из смеси двух полимеров (70% ПКЛ и 30% ПЭГ-2NH₂). Для модификации матриц на основе ПКЛ их инкубировали в 0,5M водном и 0,25M водно-спиртовом растворах аргинина при T=40°C (1 час) и T=25°C (24 часа), а композитные матрицы инкубировали в воде в течение суток для растворения фазы ПЭГ-2NH₂.

С помощью СЭМ, АСМ и оптической микроскопии было выявлено, что для ПКЛ матриц характерна кристаллическая структура, форма и размер которой зависят от условий формирования матриц, и, что после инкубирования композитных матриц происходит формирование порок или лунок на поверхности ПКЛ. Методом сидячей капли было доказано увеличение гидрофильности матриц после их модификации. Также было изучено распределение аминогрупп на поверхности матриц за счет химически пришитой метки FITS.

Влияние модификаций на адгезию и пролиферацию оценивали с помощью конфокальной микроскопии.

Было выявлено, что любая модификация оказывает положительное влияние на культивирование МСК, однако наибольшее влияние на культивируемые клетки оказывает модификация ПКЛ матриц в течение 24 часов 0,5М водным и 0,25М водно-спиртовым растворами аргинина, а для композитных матриц — ПКЛ/ПЭГ-2NH₂ после инкубации. Это подтверждается подсчетом количества клеток после культивирования в течении 2, 4 и 24 часов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-03-00400 А.

Литература:

1. Nashchekina Y. et al. *Int. J. Mol. Sci. J.* 2020. V. 21. P. 6989.
2. Nashchekina Y. et al. *Polymers. J.* 2020. V. 12. P. 1969.

СВОЙСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА, НАНЕСЕННЫХ МЕТОДОМ ALD

А.А. Чагаров

Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

e-mail: megalowin188@mail.ru

Ключевые слова: имплантат, наноструктурирование, титан, поверхность

Современная стоматология, одним из решений проблемы потери зубов, предлагает дентальную имплантацию. В связи с этим возрос интерес врачей-стоматологов хирургов и ученых к техническим характеристикам дентальных имплантатов. Сплавы титана давно применяются в медицине для производства различных видов имплантатов. Это связано с биосовместимостью титана и процессом остеоинтеграции, открытым П.-И. Бранемарком в 1960-х годах

Успех остеоинтеграции зависит от ряда факторов: общесоматического состояние организма пациента, соблюдение протоколов оперативного вмешательства и, конечно от поверхности имплантата [1, 2]. Таким образом, модификация поверхности имплантатов может значительно влиять на процессы остеоинтеграции, тем самым способствовать достижению прогнозируемых результатов [3].

Цель исследования. Получение и исследование микроструктуры и шероховатости пленок диоксида титана, полученных методом ALD

Материалы и методы исследования. На 10 образцах прототипов дентальных имплантатов, изготовленных из титанового сплава BT6, были получены пленки диоксида титана (TiO₂). Изготовлено 10 образцов с различной толщиной. Погрешность ±2 нм. Способ получения — метод плазмоактивированного атомно-слоевого осаждения (ALD). Нанесение покрытия происходило на установке TFS 200 (Veeco, Финляндия) с источником ёмкостно-связанной плазмы. Полученные покрытия исследовали с помощью микроскопов и спектрометров.

Результаты исследований. Осаждение пленок диоксида титана производилось на прототипы титановых имплантатов.

После нанесения пленки из диоксида титана проводили исследование микроструктуры и шероховатости нанесенных пленок.

Исследование элементного состава поверхностного слоя образца пленки показало, что с увеличением ее толщины, уменьшается концентрация алюминия и ванадия.

Заключение. Уменьшения массовой доли алюминия в поверхностных слоях свидетельствует об эффективности использования покрытий диоксида титана, выращенных методом ALD, в качестве барьерных слоев для снижения выхода примесей на поверхности титановых имплантатов и их негативного влияния на ткани живого организма.

Литература:

1. Козлова М.В., Мкртумян А.М., Базибян Э.А., Беякова А.С., Дзиковицкая Л.С. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия, 2019. С. 46–51.
2. Бутовский К.Г. и др. Электроплазменное напыление в производстве внутрикостных имплантатов. Саратов: Саратов. гос. техн. ун-т, 2006. С. 200.
3. Шубладзе Г.К. Медицинский алфавит 13/2014. С. 20–25.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ДЕЛЕЦИЙ ЗОН УСКОРЕННОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА В ЛОКУСЕ CNTN6 В РАННИХ ЭТАПАХ НЕЙРОГЕНЕЗА

А.С. Чвилёва¹, А.М. Юнусова², И.Е. Пристяжнюк², А.С. Рыжкова², А.В. Смирнов², П.С. Белокопытова^{1,2}, Т.А. Шнайдер²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: a.chvileva@g.nsu.ru

Ключевые слова: HAR, CNTN6, церебральные органоиды, нейрогенез, регуляторные элементы.

Наследственные интеллектуальные нарушения встречаются у 2–3% родившихся детей. Показано, что до 25% этих патологий связаны с вариабельностью числа копии генов. Одним из ярких примеров является ген CNTN6 [1]. Большинство описанных мутаций в гене представлены CNV крупных размеров, вызывающие нарушения умственного развития человека, однако точечная мутация была обнаружена только в одном клиническом случае.

По этой причине было выдвинуто предположение о наличии регуляторных элементов в локусе CNTN6, удаление которых может приводить к нарушениям ранних этапов нейрогенеза человека. С помощью биоинформационного анализа в данном локусе были выявлены две зоны ускоренного развития человека — HAR (Human Accelerated Regions) [2], которые могут выполнять энхансерную функцию. Целью данной работы является исследование роли HAR в локусе CNTN6. С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 были получены линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с делециями районов, содержащих HAR. Полученные линии были дифференцированы в церебральные органоиды [3], для которых проведен морфологический анализ особенностей ранних этапов нейрогенеза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-29-04067 мк) и Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1063). Культивирование линий ИПСК проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепрофилактического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН. Микроскопический анализ проведен на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Литература:

1. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. Mol Cytogenet. 2014. V. 7. Art. № 97.
2. Pollard K.S., Salama S.R., Lambertet N. et al. Nature. 2006. V. 443. P. 167.
3. Lancaster M.A., Renner M., Martinet C. et al. Nature. 2013. V. 501. P. 373.

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЭФФЕКТИВНОСТИ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО
ГИДРОГЕЛЯ ИЗ ПУПОВИНЫ
ЧЕЛОВЕКА В ВОССТАНОВЛЕНИИ
ВНУТРИСУСТАВНОГО ДЕФЕКТА
ХРЯЦА**

С.В. Чеботарев, Л.И. Калюжная, А.Л. Кудяшев

*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: sergeichebotarev90@gmail.com

Ключевые слова: тканевая инженерия, Вартонов студень, децеллюляризация, гидрогель.

Спонтанная регенерация повреждений хряща невозможна в силу анатомо-физиологических особенностей ткани, терапевтические методики восстановления дефектов малоэффективны, хирургические технологии проводятся в нескольких этапов и показывают краткосрочную эффективность. Тканеинженерные продукты из биоматериалов в настоящее время привлекают особое внимание специалистов.

В нашей лаборатории изготовлен и запатентован тканеинженерный гидрогель из Вартонова студня. Целью исследования было показать эффективность гидрогеля из пуповины человека в восстановлении дефекта гиалинового хряща в эксперименте.

Формирование дефекта хряща мышечка бедренной кости у 31 кролика производили фрезой диаметром и глубиной 3 мм. Животным контрольной группы (n=16), на 14, 21, 28 дни после операции внутрисуставно вводили 0,4 мл физиологического раствора, кроликам опытной группы (n=15) — 0,4 мл гидрогеля из пуповины. С помощью МРТ измеряли глубину и диаметр повреждения на 60-е и 90-е сутки наблюдения.

В группе контроля диаметр дефекта, в соответствии с явлениями вторичной альтерации, к 60-м суткам увеличивался, достигая 3,2 мм; в опытной группе составил 2,6 мм. К 90-м суткам размеры повреждения составляли 4,8 и 2,1 мм соответственно. Глубина дефектов на 60-е сутки составила 3,0 и 2,7 мм, на 90-е сутки — 2,2 и 1,7 мм в контрольной и опытной группах. Зарегистрировано достоверное уменьшение размеров дефекта у кроликов, леченных гидрогелем пуповины (p<0,05).

Разработанный нами тканеинженерный гидрогель, уже к 60-м суткам после моделирования дефектов способствует частичному уменьшению размеров дефекта хряща, а к 90-м суткам формирует гиалиноподобную ткань.

Литература:

1. Калюжная-Земляная Л.И. и др. Способ изготовления бесклеточного гидрогеля из Вартонова студня пуповины человека для внутрисуставного применения. Патент
2. Калюжная Л.И., Хомянец В.В., Чеботарев С.В. и др. Профилактическая и клиническая медицина. — 2019. — № 4. — С.45–52.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ИЗМЕНЕНИЯ ТЕЛОЦИТОВ В ЗОНЕ ВЕНОЗНЫХ
ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

**И.А. Чекмарева¹, Х.А. Абдувосидов^{2,3},
О.В. Паклина¹**

¹ ФГБУ НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского
Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Московский государственный
медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³ ГБУЗ Московский клинический научный центр
им. А.С. Логинова, Москва, Россия

e-mail: chia236@mail.ru

Ключевые слова: трофическая язва, телоциты, репаративные процессы.

Одним из осложнений хронической венозной недостаточности (ХВН) нижних конечностей является образование трофических язв [1, 2]. Целью исследования было изучение структурно-функционального состояния телоцитов (ТЦ) в зоне язвенного дефекта.

Обследовано 36 больных, страдающих венозными трофическими язвами, из них 25 женщин и 11 мужчин. Средний возраст пациентов составил $66 \pm 2,5$ лет. Длительность ХВН в среднем составила $18 \pm 1,7$ лет, длительность трофической язвы $29 \pm 3,4$ месяцев.

ТЦ представляют собой особый тип интерстициальных клеток, характеризующийся небольшим клеточным телом и чрезвычайно длинными (десятки-сотни мкм) и тонкими цитоплазматическими отростками (менее 100 нм) — телоподиями. Функционально ТЦ образуют трехмерную интерстициальную сеть за счет гомоклеточных и гетероклеточных взаимодействий. ТЦ обычно выстилают коллагеновые и эластичные волокна, находятся рядом с тучными клетками, фибробластами, адипоцитами, кровеносными сосудами, нервами и придаточными структурами кожи. ТЦ объединяют клетки в единую систему и обеспечивают поддержание гомеостаза кожи.

В зоне трофических язв нарушена ауторегуляция воспалительных и репаративных процессов. Десинхронизация фаз воспаления и регенерации проявляется в ослаблении макрофагальной реакции, расстройстве системы микроциркуляции, нарушении межклеточных взаимодействий. Происходит формирование избыточной грануляционной ткани с развитием фиброза, процесс репарации тормозится. Большая часть капилляров была «замурована» в фиброзную ткань. Нет контактов между ТЦ и перичитами, эндотелиальными клетками, нервными волокнами. ТЦ деструктивно изменены, на что указывала цитоплазматическая вакуолизация, потеря органелл, резкое укорочение цитоплазматических отростков.

Заключение. Поскольку ТЦ могут участвовать в нескольких процессах, таких как механическая поддержка, нейротрансмиссия, межклеточная передача сигналов и регенерация соединительной ткани, потеря и деструкция этих клеток в зоне венозных трофических язв может иметь важные патогенетические последствия для процесса заживления.

Литература:

1. Chekmareva I., Paklina O., Abdvosidov H. et al. Chirurg — 2014. — No 5. — P. 51–58.
2. Абдувосидов Х.А., Снигоренко А.С., Чекмарева И.А. и др. Хирург. — 2015. — № 2. — С. 15–21.

ТЕЛОЦИТЫ (ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ КАХАЛЕПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ) В РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ РАН

И.А. Чекмарева^{1,2}, О.В. Паклина¹

¹ ФГБУ НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

² Научно-образовательный ресурсный центр Молекулярная морфология, РУДН, Москва, Россия

e-mail: chia236@mail.ru

Ключевые слова: асептическая рана, телоциты, ультраструктура.

Телоциты (ТЦ) представляют собой уникальный тип интерстициальных клеток со специфическими, чрезвычайно длинными (45–125 нм) и тонкими цитоплазматическими отростками называемыми телоподиями, которые состоят из тонких сегментов — подомеров и расширенных — подомов, в которых находятся митохондрии и фрагменты эндоплазматической сети. ТЦ экспрессируют c-kit / CD117, CD34 и виментин. ТЦ в последнее время привлекают все больше внимания, поскольку могут играть потенциальную роль в регенеративной медицине.

Целью настоящего исследования было изучение ТЦ в процессе заживления асептических кожных ран в эксперименте. Исследования проведены на 40 самцах белых беспородных крыс весом 150–200 граммов. У животных моделировали раны с асептическим воспалением. Для определения структурно-функционального состояния клеток грануляционной ткани на 1, 2, 3, 4 и 7 сутки лечения ран было проведено электронно-микроскопическое исследование биоптатов.

На 1–2 сутки раневого процесса в области дна раны находили фибробласты, капилляры, адипоциты и единичные ТЦ с характерными длинными телоподиями, с помощью которых они контактировали друг с другом, а также с эозинофильными лейкоцитами, лимфоцитами, фибробластами, макрофагами и мезенхимальными стволовыми клетками. Возможно, контактируя с иммунокомпетентными клетками, ТЦ выступали в качестве активных участников воспалительного и иммунного ответа. На 3–4 сутки увеличилось количество ТЦ в области дна раны среди новообразованных капилляров, фибробластов. Посредством телоподий ТЦ контактировали с эндотелиоцитами, перицитами. В основном это были простые межклеточные контакты. Дистанционное взаимодействие происходило посредством микровезикул, которые образовывались в результате отрыва от плазматической мембраны. Ранее было показано, что микровезикулы содержат микро-РНК, ангиогенные факторы [1] посредством которых возможно влияние на неоангиогенез в ране. На 7 сутки раневые дефекты были заполнены зрелой грануляционной тканью с большим количеством фибробластов и коллагеновых волокон среди которых отмечали отростки ТЦ.

Проведенное исследование показало наличие ТЦ в асептической ране всех сроках заживления, количество и распространение ТЦ в грануляционной ткани в процессе заживления ран увеличивалось, увеличивалось количество гетеро- и гомоклеточных контактов, что позволяет предположить активную роль ТЦ в процессе репаративной регенерации. В зрелой грануляционной ткани ТЦ выступали в качестве поддерживающих клеток. Дальнейшие исследования биологических функций ТЦ послужат основой для получения нового представления о потенциальной терапевтической роли ТЦ в регенеративной медицине.

Литература:

1. Dragos Cretoiu, Jiahong Xu, Junjie Xiao et al. J. Mol. Sci. 2016, V.17. № 8. P. 1322.

ОСОБЕННОСТИ АРТЕРИОГЕНЕЗА ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

И.А. Чекмарева¹, А.В. Ревущин², Г.В. Павлова², С.В. Сдобникова¹

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

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

e-mail: sдобnikova_sv@mail.ru

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, ангиогенез, артериогенез

Возможности офтальмоскопии позволяют прижизненно изучать новообразованные сосуды (НС) при пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) вследствие: 1. прозрачности сред, 2. легкости дифференцировки НС в результате их экстраретинального роста; 3. возможности изучения удаленных в ходе операций НС. Несмотря на важность изучения неоангиогенеза при ПДР, систематизированного исследования НС предпринято не было, что может быть объяснено сложностью получения клинического материала и отсутствием экспериментальной модели. Тем не менее, общепризнано, что НС при ПДР берет начало от венул.

Наше ангиографическое и патоморфологическое исследования, выполненные с 1997 по 2019 годы, показали, что в жизненном цикле НС основную роль играет наличие или отсутствие их перфузии кровью. Характеристикой, определяющей направление эволюции ПДР — прогрессирование, стабилизация или регресс — является наличие коммуникации эпицентров ангиогенеза (ЭА) с ретинальными артериолами.

На всех стадиях развития ЭА демонстрируют воспроизводимую конструкцию. Ее архитектура уникальна. На развитых стадиях в ЭА выявлены все отделы, присущие классической системе региональной гемодинамики. НС при ПДР развиваются таким образом, что ее «зона роста» постепенно мигрирует от точки врастания ЭА. Следствием подобного механизма является формирование зональной конструкции сосудистой системы. При ультраструктурном и иммуногистохимическом исследовании во всех таких случаях были выявлены НС, имеющие строение типичное для артерий.

Таким образом, при прогрессировании ПДР гемодинамический фактор является определяющим, в его основе лежит наличие коммуникации ЭА с ретинальными артериолами. Результатом этой коммуникации является преобразование новообразованных экстраретинальных капилляров в артериальные сосуды. В настоящем исследовании впервые представлено патоморфологическое доказательство возможности артериогенеза при ПДР de novo.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ МАТРИКСОВ КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**Е.В. Чепелева¹, М.Б. Васильева²,
Е.В. Кузнецова¹, Д.С. Сергеевичев¹**

¹ ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина
МЗ РФ, Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

e-mail: e_chepeleva@meshalkin.ru

Ключевые слова: тканевая инженерия, ксенографт, децеллюляризация, цитотоксичность, соединительнотканый каркас, сердечно-сосудистая хирургия.

Дефицит донорских аллогraftов для замещения пораженных клапанов сердца и кровеносных сосудов малого диаметра порождает необходимость разработки и создания тканеинженерных протезов на основе соединительнотканых матриксных животного происхождения [1]. Децеллюляризованные биологические матриксы обеспечивают механическую анизотропию и повторяют строение стенки нативных клапанов, могут замещать соединительнотканый каркас пораженных тканей и способствовать их рецеллюляризации клетками реципиента в дальнейшем [2]. Оптимизация методов децеллюляризации направлена на сохранение биомеханических свойств тканей, снижение остаточных количеств донорского клеточного материала и компонентов децеллюляризирующих растворов.

В качестве экспериментального материала использовали фрагменты дуги аорты и легочного ствола свиней породы Ландрас. Для децеллюляризации использовали растворы из комбинации дезоксихолата натрия и додецилсульфата натрия в соотношениях 0,5% / 0,5% и 0,5% / 0,1% соответственно, а также раствор из смеси 0,1% дезоксихолата натрия и 1% Тритона X100. Отмывку производили в стерильном фосфатном буферном растворе (pH=7,4). Прочностные характеристики материала оценивали при одноосном растяжении в продольном и поперечном направлениях, структуру соединительнотканного матрикса оценивали с помощью стандартных гистологических и иммуноцитохимических исследований. Исследование цитотоксичности материала для определения оптимальной продолжительности отмывки было проведено при сокультивировании образцов с фибробластами линии L-929 и последующим ХТТ-тестом.

Установлено, что наиболее эффективным составом для удаления клеточных элементов из стенки аорты или легочного ствола свиней с высоким уровнем сохранения структуры и механических свойств матрикса является раствор из 0,5% додецилсульфата и 0,5% дезоксихолата натрия. Для децеллюляризации стенки легочного ствола также может использоваться раствор из 1% Тритона X100 и 0,1% дезоксихолата натрия. Для полного удаления клеточного материала из стенки аорты свиньи требуется 24 часа, для легочного ствола — 16 часов. Исследование остаточной токсичности материалов *in vitro* показало, что число циклов отмывок после децеллюляризации должно быть не менее 8, длительностью не менее 12 часов каждый. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России № 121031300224-1.

Литература:

1. Horke A., Tudorache I., Laufer G. et al. Eur. J. Cardiothorac Surg. 2020. V. 58. №. 5. P. 1045–1053.
2. VeDepo M.C., Detamore M.S., Hopkins R.A., Converse G.L. J. Tissue Eng. 2017. V. 8. Art. № 2041731417726327.

АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ КЛЮЧЕВЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КОЛЛАГЕНОВОМ ГЕЛЕ

**Э.С. Чермных¹, Е.П. Калабушева¹, Е.В. Алпеева¹,
С.П. Домогатский^{2,3}, Е.О. Осидак², Е.А. Воротеляк¹**

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова,
Москва, Россия

² ООО фирмы «ИМТЕК», Москва, Россия

³ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва,
Россия

e-mail: elinachermnykh@mail.ru

Ключевые слова: эквивалент кожи, дермальные фибробласты, клетки дермальной папиллы, коллагеновый гель.

Активация ключевых сигнальных каскадов, регулирующих морфогенетический потенциал клеток дермальной папиллы (ДП) и дермальных фибробластов (Фб), была проанализирована на модели дермального эквивалента кожи. Для исследования состояния каждого сигнального пути (BMP, Wnt, TGF- β) коллагеновые гидрогели плотностью 5 мг/мл, содержащие клетки ДП или Фб, обрабатывали специализированными ингибиторами или активаторами данных каскадов (Bmpr4, CHIR 99021, LDN-193189, Y-27632, SB-431542, SU6656).

При исследовании морфологии клеток и их отростков было обнаружено, что ингибирование каскадов TGF- β /BMP (LDN-193189) и активация Wnt-пути (CHIR 99021) препятствуют расплыванию клеток и формированию их отростков. Культивирование клеток с добавлением Rock-ингибитора (Y-27632), наоборот, усиливало расплываемость клеток. Остальные вещества не оказывали значительного влияния, по сравнению с контролем. При помощи иммуногистохимического исследования была исследована экспрессия MKL1, NF- κ B и SMAD4. Была выявлена повышенная экспрессия MKL1, NF- κ B и SMAD4 в Фб, что может говорить об их склонности к фибротическим изменениям, к которым эти клетки склонны и в условиях *in vivo*. Экспрессия MKL1 в клетках ДП была ниже, чем в Фб, что свидетельствует об их меньшей склонности к фиброзу.

Для изучения механизмов наблюдаемых эффектов требуются дальнейшие углубленные исследования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04060.

СТИМУЛЯЦИЯ АДИПОГЕНЕЗА АУТОЛОГИЧНЫМИ СЫВОРОТКАМИ В КУЛЬТУРЕ ЭКСПЛАНТОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРОЛИКОВ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ

**М.В. Черноуцкий, М.Б. Белякова,
Н.В. Костюк, О.В. Волкова, М.Н. Калинин**

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский
университет Минздрава РФ, Тверь, Россия

e-mail: michail1911@mail.ru

Ключевые слова: адипогенез, аутологичные сыворотки, культивирование жировых клеток, модель гиперлипидемии.

В данной работе моделировалась гиперлипидемия у кроликов и изучалось изменение адипогенного потенциала их жировой ткани в культуре, с использованием аутологичных гиперлипидных сывороток взрослых животных с целью выявить значимость воздействия системных организменных факторов на адипогенез.

Забор материала производили с соблюдением биозитических норм. Кроликам делали внутривенные инъекции липидсодержащей эмульсии 21 день по 1 мл/кг, последний забор сыворотки проводили спустя 1,5 месяца после формирования гиперлипидемии. Культивирование эксплантов проводили в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением аутологичных сывороток кроликов на разных сроках гиперлипидемии. Оценивали миграцию и пролиферацию адипоцитов из эксплантов, а также способность к накоплению липидов под действием инсулина.

Клетки от экспериментального животного при культивировании с аутологичной сывороткой, полученной до гиперлипидемии, отвечали на стимуляцию инсулином ускорением пролиферации клеток и в малой степени — накоплением жировых капель. Если использовалась сыворотка, полученная в ходе эксперимента с этим же животным, накопление липидов становилось быстрым и выраженным.

Клетки интактного кролика пролиферируют сильнее в сравнении с клетками животного, которое уже побывало в эксперименте, однако самая активная пролиферация отмечалась при культивировании с аутологичной сывороткой, собранной спустя 1,5 месяца от формирования экспериментальной гиперлипидемии. В данном эксперименте отмечались самый плотный застил клеток с потерей контактного торможения и наибольшее количество делящихся клеток.

Гиперлипидемическая модель животного в данной работе показала, что ответ жировой ткани меняется не только в ходе гиперлипидемии, но и сохраняется после нормализации транспорта липидов в такой клеточной популяции. Также и плазма крови, нормальная по содержанию липидов, сохраняет системные факторы адипогенеза и остается способной стимулировать его в клетках нормальной ткани в культуральных условиях.

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ VCL-2K17D ПРИ ПОМОЩИ AAV-ВЕКТОРА СНИЖАЕТ ЧИСЛО АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК В МОЗГЕ 5FAD МЫШЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Д.П. Чернюк¹, М.И. Полозова¹, Е.И. Пчицкая¹, Г. Балтынк², И.Б. Безпрозванный^{1,3}

¹ Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Лаборатория молекулярной и клеточной сигнализации, КУ Левена, Левен, Бельгия

³ Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр штата Юта, Даллас, США

e-mail: dashachernuk@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, аденоассоциированные вирусы, Vcl-2, кальциевый сигналинг, IP3R, RyR, 5FAD, амилоидные бляшки.

Одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний — болезнь Альцгеймера (БА), является самой частой причиной развития деменции. По одной из гипотез патогенеза БА причиной заболевания может

служить продуцируемый в нейронах токсичный бета-амилоид. По другой гипотезе к гибели нейронов приводит неправильная регуляция ионов кальция [1]. Нейроны очень чувствительны к внутриклеточному Ca²⁺ гомеостазу, поэтому даже самые малые аномалии в Ca²⁺ сигнализации могут привести к разрушительным последствиям в течение длительного периода времени.

Последние исследования показали, что экспрессия белков семейства Vcl-2 ингибирует активность IP3R1 [2] и RyR2 [3], которые являются основными каналами выхода Ca²⁺ из эндоплазматического ретикула (ЭР) во внутриклеточное пространство. Таким образом, мы предположили, что гиперэкспрессия белков Vcl-2 может оказать положительный эффект на дисрегуляцию Ca²⁺ гомеостаза при патологии БА. Чтобы проверить данную теорию *in vivo* мы использовали аденоассоциированные вирусы для экспрессии белков Vcl-2 в CA1 области гиппокампа 5FAD мышшиной модели БА на ранних стадиях развития болезни. Для того, чтобы оценить важность специфичной ассоциации с IP3R1 или RyR2, экспрессировалась также и мутантная форма Vcl-2K17D. Мы произвели проверку взаимодействия белков Vcl-2 и Vcl-2K17D с IP3R1 и RyR2 в гиппокампе 5FAD мышей при помощи метода ко-иммунопреципитации. Результаты подтвердили, что белок Vcl-2 взаимодействует с IP3R1 и RyR2, а Vcl-2K17D связывается только с RyR2. Далее был проанализирован эффект двух форм Vcl-2 на число амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей. Данные показали, что гиперэкспрессия белка Vcl-2 не снижает числа амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей, в то время как Vcl-2K17D значительно сокращает число бляшек.

Резюмируя, мы можем сделать предположение, что на 5FAD мышшиной модели БА ингибирование только RyR2-зависимого кальциевого выхода из ЭР приводит к большему терапевтическому эффекту, нежели блокировка и RyR2, и IP3R1 каналов. Обнаруженные нами особенности сигнального Ca²⁺ пути в нейронах при патологии БА являются перспективной мишенью для дальнейшего поиска терапии БА. Поддержано РНФ № 20-45-01004

Литература:

1. Bezprozvanny, I. (2009). Trends Mol Med 15(3): 89–100.
2. Rong, Y. P., et al. (2008). Mol Cell 31(2): 255–265.
3. Vervliet, T., et al. (2014). J Cell Sci 127(Pt 12): 2782–2792.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОВЕРЭКСПРЕССИИ БЕЛКА CONTACTIN 6

С.А. Чечеткина¹, А.М. Юнусова², И.Е. Пристяжнюк², Т.А. Шнайдер²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: s.tschetschekina@gmail.com

Ключевые слова: умственная отсталость, церебральные органоиды человека, Contactin 6.

Развитие головного мозга человека представляет собой последовательный многоэтапный процесс, в котором любые отклонения могут приводить к расстройству интеллектуальных функций. Нарушения нейрогенеза представляют разнородную группу заболеваний. Одной из встречающихся патологий является умственная отсталость, ассоциированная с мутациями в гене *CNTN6* [1]. У млекопитающих

белок Contactin 6 отвечает за рост аксонов, детритогенез и формирование синапсов. Однако его роль в нейрогенезе человека до сих пор остается мало изученной.

Одной из главных проблем изучения патологий, проявляющихся в нарушении умственного развития, является отсутствие модели для реконструкции заболевания. Несмотря на консервативность ранних этапов нейрогенеза у млекопитающих, многие аспекты и клинические проявления невозможно воспроизвести на лабораторных животных. К настоящему моменту, разработаны технологии получения пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их направленной дифференцировки в церебральные органоиды [2], которые позволяют преодолеть подобные ограничения.

Для изучения ранних этапов нейрогенеза были получены церебральные органоиды человека из линий ИПСК, мутантных по гену *CNTN6*. В AAVS локус этих линий ИПСК внесена генетическая конструкция, позволяющая активировать сверхэкспрессию Contactin 6. Обнаружено, что сверхэкспрессия белка Contactin 6 в нокаутных по гену *CNTN6* органоидах обеспечивает частичное восстановление фенотипа, которое проявляется в виде увеличения количества нейроэпителиальных структур. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04067 мк) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075-15-2021-1063). Культивирование линий ИПСК проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепроцессуального и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН. Микроскопический анализ проведен на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Литература:

1. Kashevarova A. et al. Mol Cytogenet. 2014 Dec 31;7(1):97.
2. Lancaster M., Renner M., Martin CA. et al. Nature 501, 373–379 (2013).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ

В.И. Чечехин, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин

Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: v-chech@mail.ru

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, мезенхимные стволовые клетки, норадреналин, ожирение, артериальная гипертензия, анализ транскриптома одиночных клеток.

Артериальная гипертензия является одним из самых распространенных сердечно-сосудистых заболеваний в мире и выступает в качестве фактора риска развития множества заболеваний. При этом порядка 60–70% случаев артериальной гипертензии ассоциировано с ожирением. Ожирение приводит к усилению симпатической иннервации, что приводит к повышению артериального давления. Однако не все случаи ожирения приводят к развитию артериальной гипертензии. Контроль функций жировой ткани и ее сосудов осуществляют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), популяция которых включает перicytes. В качестве модели усиления симпатической

стимуляции мы использовали двукратное добавление норадреналина с интервалом в 6 часов. Ранее мы показали, что стимуляция МСК в этих условиях приводит к усилению чувствительности клеток к норадреналину. В данной работе мы изучали, как влияет норадреналин на функциональную активность МСК и их способность к контракции.

Используя иммуногистохимическое окрашивание жировой ткани, мы определили, что $\alpha 1A$ -АР локализуется не в ГМК и не в эндотелии, а в МСК, располагающихся рядом с симпатическими нервными волокнами. Далее мы показали, что способность к повышению в ответ на действие норадреналина чувствительности клеток к контрактильным сигналам коррелирует с уровнем артериального давления у пациентов с ожирением. Используя анализ транскриптома одиночных клеток, мы показали, что после двукратной стимуляции норадреналином происходит увеличение количества муральных и фибробластоподобных клеток. Функциональность наблюдаемых изменений клеток проверяли с помощью модели контракции коллагеновых дисков. При двукратном действии норадреналина происходит значительное усиление контракции МСК коллагеновых дисков. Используя вестерн-блоттинг, мы установили, что через 6 часов после стимуляции норадреналином в МСК повышается уровень $\alpha 1A$ -АР. Используя ПЦР и ингибиторы трансляции и транскрипции, мы показали, что при действии норадреналина происходит увеличение трансляции $\alpha 1A$ -АР, но не изменяется уровень мРНК данного белка. Используя ингибиторный анализ, мы показали, что норадреналин повышает $\alpha 1A$ -АР через каскад $\beta 3$ -АР/аденилатциклаза/цАМФ/РКА. При этом иммуноферментный анализ показал, что РКА при действии норадреналина не входит в ядро клетки, а, вероятно, действует на цитоплазматические мишени.

Таким образом, сенситизация $\alpha 1A$ -АР в МСК при действии норадреналина запускается сигнальным каскадом $\beta 3$ -АР/аденилатциклаза/цАМФ/РКА и активацией трансляции, но не транскрипции. При двукратном воздействии норадреналином в МСК увеличивается доля контрактильных муральных и фибробластоподобных клеток. Финансирование: Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках проекта № 21-15-00311.

АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЙ БЕЛОК Bcl-2 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С РЕЦЕПТОРОМ IP3R И ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЧИСЛО СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ В ГИППОКАМПЕ 5FAD МЫШЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

М.Е. Чигряй¹, А.В. Раковская¹, Д.П. Чернюк¹, А.Б. Гордеев¹, Е.И. Пчицкая¹, Г. Балтынк², И.Б. Безпрозванный^{1,3}

¹ *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

² *Лаборатория молекулярной и клеточной сигнализации, КУ Левена, Левен, Бельгия*

³ *Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр штата Юта, Даллас, США*

e-mail: margarita075@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, апоптоз, рак, адеиноассоциированные вирусы, Bcl-2, IP3R.

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой самую распространенную форму деменции. Несмотря на широкую распространенность данного заболевания,

в настоящее время не существует эффективного лечения БА. Одним из характерных патологических признаков является нарушение регуляции Ca^{2+} в нейронах [1], которое приводит к сокращению синаптических контактов в нейронах гиппокампа.

Белки Vcl-2 являются важными модуляторами динамики внутриклеточного Ca^{2+} . Vcl-2 ингибирует высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула (ЭР) посредством ингибирования инозитол-1,4,5-трифосфатного (IP3Rs) и рианодинового (RyR2) рецепторов. Связывание Vcl-2 с IP3R подавляет проапоптотическую передачу сигналов Ca^{2+} , указывая на то, что комплекс Vcl-2-IP3R может представлять собой потенциальную терапевтическую мишень при лечении БА и некоторых видов рака.

В данном проекте мы оценили синаптопротекторные свойства белка Vcl-2 в 5FAD мышинной модели БА. Для этого были проинжектированы аденоассоциированными вирусами, кодирующими белки Vcl-2 и Vcl-2K17D, в котором мутация K17D нарушает функцию связывания с IP3R1. Результаты показали, что гиперэкспрессия Vcl-2 способствует предотвращению синаптотоксического эффекта на нейроны, гиперэкспрессия Vcl-2K17D также уменьшает потерю синаптических контактов, но в меньшей степени, чем Vcl-2.

Так же была оценена ко-локализация Vcl-2 и IP3R в гиппокампальных нейронах. Было обнаружено, что оба белка находятся в some нейронах, преимущественно в виде кластеров, при этом окрашивание срезов мозга на митохондриальный маркер Tom20 показал, что белок Vcl-2 преимущественно локализуется в митохондриях. Результаты исследований показали, что Vcl-2 и IP3R характеризуются низким уровнем совместной локализации как в нейронах гиппокампа дикого типа, так и в линии 5xFAD. С помощью экспансионной микроскопии [2], было показано, что некоторые кластеры Vcl-2 контактируют с кластерами IP3R, таким образом, контактируя с кластерами IP3R1. Это подтверждает предположение о том, что эти белки расположены в разных клеточных органеллах, IP3R1 — в ЭР, а Vcl-2 — в митохондриях, где он кластеризуется в местах контакта с ЭР, в так называемых митохондриально-ассоциированных мембранах. Поддержано РФФИ № 20-45-01004.

Литература:

1. I. Vezprozvanny et al. Trends Neurosci. 31 (2008) 454–463.
2. Деревцова К.З. и др. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 107 (2021) 4–5.

ИЗУЧЕНИЕ NOTCH — ОПОСРЕДОВАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЁГОЧНЫХ РЕЗИДЕНТНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

И.В. Чистякова¹, Н.И. Бакаленко¹, М.А. Атюков², А.Б. Малашичева¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: itjeren7@gmail.com

Ключевые слова: Notch, лёгочные фибробласты, миофибробласты, дифференцировка.

Миофибробласты участвуют в репарации/ремоделировании поврежденной ткани путём синтеза внутриклеточного матрикса. Однако, при нарушении репаративного

процесса, избыточная продукция матрикса персистирующими миофибробластами может привести к развитию фиброза. Миофибробласты имеют множественное происхождение и включают резидентные фибробласты, фиброциты, эпителиальные клетки, подвергающиеся эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [1]. Известно, что сигнальный путь Notch, представленный у млекопитающих четырьмя типами рецепторов (Notch1-4), участвует в регуляции дифференцировки миофибробластов в развитии фиброза различных органов и тканей [2, 3, 4]. В ряде исследований было показано, что Notch1 и Notch3 опосредуют миофибробластную дифференцировку клеток легких [2, 3].

Цель исследования — оценить влияние активации 4-х рецепторов Notch на резидентные лёгочные фибробласты человека.

В работе использовали культуру лёгочных фибробластов человека, полученную в результате частичной резекции лёгкого. Notch-зависимую активацию клеток осуществляли путем введения лентивирусного вектора, несущего внутренний домен Notch-рецепторов (NICD1-4). После трансдукции культивирование клеток проводили в течении 8 дней. С помощью методов ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимии анализировали изменения экспрессии маркеров ЭМП (SNAIL, SLUG) и миофибробластов (α -SMA).

Нами было установлено, что активация NICD1-4 приводит к усилению экспрессии маркеров ЭМП SNAIL, SLUG, и α -SMA. Интересно, что в нашем случае наиболее выраженный эффект наблюдался в лёгочных фибробластах, трансдуцированных конструкцией NICD4. Участие этого рецептора ранее не было показано в профибротических процессах как в легких, так и в других тканях.

Таким образом, NICD2/NICD4-зависимая активация способствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты, наряду с NICD1/NICD3, являющимися одними из ключевых факторов, участвующих в развитии фиброза. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грантовое соглашение № 075-15-2021-1075).

Литература:

1. Micallef L., Vedrenne N., Billet F. et al. Fibrogen. Tis. Rep. 2012. V.5. S.1.S5.
2. Liu T., Hu B. et al. Am.J. Pathol. 2009. V. 174. № 5. P.1745–1755.
3. Vera L., Garcia-Olloqui P. et al. Am.J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2021. V. 64. № 4. P. 465–476.
4. Hu B., Phan S.H. Pharmacol Res. 2016. V. 108. P. 57–64.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНА 2

Д.С. Чулпанова, Т.В. Пухальская, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: daryachulpanova@gmail.com

Ключевые слова: интерлейкин 2, мезенхимные стволовые клетки, внеклеточные везикулы, иммунотерапия.

Почти все клетки человека выделяют внеклеточные везикулы (ВВ), которые способны переносить содержимое цитоплазмы родительских клеток и участвуют в межклеточной коммуникации. ВВ мезенхимных стволовых

клеток (МСК) представляют интерес как терапевтический инструмент для бесклеточной терапии онкологических заболеваний, поскольку описана иммуномодулирующая активность генетически модифицированных МСК, синтезирующих различные цитокины.

МСК были выделены из жировой ткани человека и генетически модифицированы лентивирусом, кодирующим ген интерлейкина 2 (IL2). Для получения индуцированных мембранных везикул (иМВ) МСК обрабатывали цитохалазином В. Для оценки иммуномодулирующих свойств иМВ МСК мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из периферической крови человека и культивировали совместно с иМВ (50 мкг/мл) в течение 72 часов. Активацию МКПК определяли путем окрашивания антителами, специфичными для поверхностных маркеров различных популяций иммунных клеток человека. Для анализа противоопухолевой активности МКПК активированные иммунные клетки добавляли к клеткам трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231. Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали с помощью RTCA xCelligence (ACEA Biosciences, США) в течение 72 часов. Жизнеспособность опухолевых клеток оценивали через 24 часа после культивирования с МКПК с использованием Annexin V Apoptosis Detection Kit (Biolegend, США).

Количество активированных Т-киллеров было в 2 раза увеличено после инкубации с иМВ-IL2 по сравнению с нативными МКПК и МКПК, инкубированными с нативными иМВ. Через 24 часа после добавления активированных иМВ-IL2 МКПК пролиферация клеток MDA-MB-231 снизилась в 4 раза по сравнению с нативными MDA-MB-231 и MDA-MB-231 инкубированными с нативными МКПК и МКПК после нативных иМВ. Такое снижение пролиферации, вероятно, связано с тем, что часть опухолевых клеток подверглась апоптозу, что подтверждается анализом жизнеспособности клеток MDA-MB-231 после 24 часов культивирования с МКПК, активированных иМВ-IL2.

Использование иМВ-IL2 может быть эффективным для лечения трижды негативного рака молочной железы, поскольку иМВ-IL2 способны активировать и стимулировать пролиферацию Т-киллеров, которые, в свою очередь, способны индуцировать апоптоз клеток рака молочной железы. Однако необходимы дальнейшие исследования эффективности иМВ на моделях опухолей *in vivo*. Работа выполнена за счет средств программы стратегического академического лидерства КФУ (ПРИОРИТЕТ-2030).

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОСТНОГО АУТОРЕГЕНЕРАТА

Г.П. Чупрынин, И.В. Супрун, Е.А. Солоп, А.А. Фоменко, А.А. Веревкин, М.Л. Муханов

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия

e-mail: chupryningp@ksma.ru

Ключевые слова: репаративный остеогенез, ауторегенерат, иммуногистохимия. Нарушение сращения переломов, особенно на фоне дефекта костной ткани, остаётся существенной проблемой травматологии и ортопедии. Среди факторов, влияющих на темпы консолидации, можно назвать состояние микроциркуляторного русла, а также наличие таких веществ, как костные морфогенетические белки (ВМР), остеопонтин и остеокальцин.

Перспективным методом заживления кости выступает использование костного ауторегенерата — организующейся гематомы из области искусственно созданного перелома, богатой необходимыми для регенерации биологически активными веществами.

Целью исследования была оценка экспрессии специфических маркеров костной ткани в процессе консолидации перелома с применением ауторегенерата.

Модель травмы создавали на 12 баранах. В экспериментальной группе (n=7) для консолидации перелома использовали остеосинтез и ауторегенерат. В контрольной группе (n=5) ауторегенерат не применяли. Приготовили гистологические препараты из фрагмента регенерировавшей кости. Провели иммуногистохимическую реакцию с антителами к остеокальцину, остеопонтину, ВМР-7 и макросиалину (CD68).

Гистологические препараты из экспериментальной группы характеризовались эффективным репаративным остеогенезом. Было выявлено большое количество костных трабекул с выраженным клеточным компонентом. Аналогичные препараты контрольной группы отличались тонкими трабекулами с малым количеством клеток. Существенных различий в строении и плотности микроциркуляторного русла не выявлено.

Подавляющее большинство клеток в препаратах из экспериментальной группы демонстрировало остеогенную дифференцировку. Об этом говорила резко положительная реакция на остеокальцин (85% всех клеток) и остеопонтин (80% клеток). ВМР-7 был выявлен в костной ткани и в прилегающей надкостнице и окружающих мягких тканях. В то же время, темпы остеокластической резорбции новообразованной кости были невысокими, о чем говорит низкое количество CD68-позитивных клеток. В препаратах контрольной группы экспрессия остеокальцина отмечалась в 60%, а остеопонтин — в 50% клеток. Экспрессия ВМР-7 отмечена на границе зоны репарации.

Морфологическая картина репаративного остеогенеза существенно различается в зависимости от применения костного ауторегенерата. Полноценное восстановление костной ткани, о котором свидетельствуют высокие уровни экспрессии специфических маркеров кости, можно связать с действием ростовых факторов и других биологически активных веществ, привнесённых в область регенерации.

КРОСС-КОРРЕКЦИЯ ДЕФИЦИТА β -ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А В МУТАНТНЫХ КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ТЕЯ-САКСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А.А. Шаймарданова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, Ш.С. Исса, А.И. Муллагулова, А.А. Титова, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.В. Тимофеева, А.М. Аймалетдинов, И.Р. Нигметзянов, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: aliceshaimardanova@mail.ru

Ключевые слова: GM2-ганглиозидоз, болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа, лизосомные болезни накопления, генная терапия, клеточно-опосредованная генная терапия, мезенхимные стволовые клетки, рекомбинантные аденоассоциированные вирусы.

GM2-ганглиозидозы представляют собой группу аутосомно-рецессивных лизосомных болезней накопления. Эти заболевания возникают в результате дефицита лизосомного фермента β -гексозаминидазы А (HexA). Дефицит HexA вызывает накопление GM2-ганглиозидов преимущественно в клетках нервной системы, что приводит к тяжелой нейродегенерации и невровоспалению. В настоящем исследовании была оценена способность генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток (МСК) восстанавливать дефицит HexA в клетках пациента с болезнью Тея-Сакса (БТС) *in vitro*, а также показана функциональность полученных клеток *in vivo*.

МСК были генетически модифицированы рекомбинантными аденоассоциированными вирусами, кодирующими кодон-оптимизированные гены α - и β -субъединиц фермента HexA (МСК-HEXA-HEXB). МСК-HEXA-HEXB культивировали с МСК пациента с БТС (мутМСК) в системе Трансвелл, после чего изучали эффективность перекрестной коррекции дефицита HexA. Крысам внутривенно вводили 4×10^6 МСК-HEXA-HEXB, контрольным группам вводили нативные МСК или физраствор.

После доставки HexA путем перекрестной коррекции в системе Трансвелл мутМСК содержали кодон-оптимизированные копии генов HEXA и HEXB. Как α^* , так и β^* субъединицы HexA были обнаружены в мутМСК после перекрестной коррекции. Показано, что после введения МСК-HEXA-HEXB активность HexA значительно повышалась в плазме и органах крыс. В органах крыс обнаружены кодон-оптимизированные копии генов HEXA и HEXB. Введение МСК-HEXA-HEXB не влияло на процент живых клеток в органах иммунной системы, лейкоформулу и уровень воспалительных цитокинов по сравнению с контрольными группами. Гистопатологический анализ не выявил существенных различий между опытной и контрольными группами.

Таким образом, эффективность кросс-коррекции дефицита HexA была показана в мутМСК после взаимодействия с МСК-HEXA-HEXB. Показано, что МСК-HEXA-HEXB экспрессируют функционально активный фермент HexA, выявляемый *in vivo*, а внутривенное введение клеток не вызывает иммунного ответа у животных. Эти данные позволяют предположить безопасность и функциональность разработанного способа клеточно-опосредованной генной терапии. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ВЕКТОРНОГО ИММУНИТЕТА

А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, В.В. Соловьева, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: aliceshaimardanova@mail.ru

Ключевые слова: метахроматическая лейкодистрофия, лизосомные болезни накопления, генная терапия, рекомбинантный аденоассоциированный вирус, векторный иммунитет, AAB9, AABrh10, арилсульфатаза А.

Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД) — аутосомно-рецессивное наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС). МЛД возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (ARSA), из-за различных мутаций в гене ARSA. Клинически МЛД проявляется прогрессирующей двигательной и когнитивной недостаточностью у пациентов. Цель исследования — проанализировать эффект последовательных внутривенных и интратекальных инъекций AAB9-coARSA или AABrh.10-coARSA и оценить их функциональную активность и биобезопасность. Мы разработали 9 и 10 серотипы AAB, кодирующих ген ARSA. Мини-пигам внутривенно вводили AAB9. Через 2 месяца животные были разделены на 2 группы. Первой группе интратекально вводили AAB9-ARSA, второй — AAB10-ARSA. Через месяц мы проанализировали эффективность трансдукции с помощью иммуногистохимического анализа (ИГХ), количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), анализа ферментативной активности ARSA и биохимического анализа крови свиней.

мПНК кодон-оптимизированного гена ARSA была обнаружена в затылочной доле коры головного мозга, мозжечке, шейном, спинном и поясничном отделах спинного мозга и ганглиях тех же отделов свиней после введения вирусов. Достоверных изменений биохимических показателей после введения препаратов не наблюдалось. При исследовании тканей ЦНС с помощью ИГХ выявлена сверхэкспрессия ARSA. После повторного введения AAB10-ARSA, количество трансдуцированных нейронов в мозжечке, спинном мозге и спинномозговых ганглиях было значительно выше, чем после введения AAB9-ARSA. Тем не менее, способность AAB10-ARSA трансдуцировать нейроны спинного мозга на уровне шейного утолщения и спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов спинного мозга значительно выше по сравнению с AAB9-ARSA. Повторное введение AAB9-ARSA приводит к наиболее эффективной трансдукции нейронов мозжечка и серого вещества спинного мозга на уровне поясничного утолщения. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

МАКРОФАГИ КАК КОМПОНЕНТ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ГИСТИОНА НА ФОНЕ ЗАКРЫТИЯ ИШЕМИЗИРОВАННОГО КОЖНОГО ДЕФЕКТА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫМ КОНСТРУКТОМ ИЗ КОЛЛАГЕНА И ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Е.Ю. Шаповалова, Ю.Г. Барановский, С.В. Харченко, И.А. Лугин, А.Г. Барановский

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия

e-mail: Shapovalova_L@mail.ru

Ключевые слова: кожный дефект, дермальный эквивалент, раневой процесс, макрофаг, фибробласт.

Целью исследования было изучение присутствия макрофагов (M) в тканях модельной

кожной ишемизированной раны на этапах заживления после трансплантации дермального эквивалента с фибробластами.

В работе использовали 56 мышей линии C57/B1 в возрасте 5–7 месяцев. Операционным путем формировали ишемизированную рану [1]. Из кожи ферментативным путем выделяли фибробласты в условиях стерильного бокса. Их соединяли с коллагеном I типа для формирования дермального эквивалента [2]. Присутствие M определяли иммуногистохимическим методом в парафиновых срезах биоптатов на 4, 7, 10, 12, 15, 19, 23 и 26 сутки после операции по наличию в клетках антигена CD68. Первичными антителами были CD68 фирмы Gene Tex Inc (США) в разведении 1:100. Обзорные срезы биоптатов окрашивали гематоксилином и эозином. Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием аналитического пакета приключения STATISTICA Enterprise (StatSoft Inc., США).

На 4-е сутки в срезах биоптатов среди клеток грануляционной ткани идентифицируются активные тканевые M. Индекс CD68-положительных клеток составляет $20,43 \pm 0,08\%$. На 7-е сутки индекс клеток, имеющих антиген CD68, уменьшился на $8,37 \pm 0,01\%$ по сравнению с 4-ми сутками. На 10-е сутки репарации индекс макрофагов (ИМ) составляет $13,25 \pm 0,01\%$ (сократился статистически достоверно на $29,22 \pm 0,04\%$ по отношению к 7-м суткам). На 12-е сутки прослеживается увеличение индекса CD68-положительных клеток статистически достоверно на $11,19 \pm 0,01\%$ по отношению к 10-му дню регенерации. В последующие изученные периоды заживления ишемизированной модельной раны на 15-е, 19-е, 23-и и 26-е сутки ИМ последовательно статистически достоверно снижается на $32,17 \pm 0,03\%$, $38,93 \pm 0,03\%$, $36,41 \pm 0,02\%$ и $43,23 \pm 0,01\%$ соответственно.

Таким образом, ИМ был самым высоким на 4-е сутки заживления раны. В последующие до 26-х суток сроки индекс CD68⁺ клеток неуклонно снижается, за исключением периода времени от 10-х до 12-х суток, когда он увеличивается, возможно, из-за способности M тормозить активность фибробластов, выделяя медиаторы воспаления и другие протеазы [3].

Литература:

1. Барановский Ю.Г., Ильченко Ф.Н., Шаповалова Е.Ю. Вестник неотложной и восстановительной хирургии. 2016. Т. 1. № 2. С. 259–261.
2. Андреев Д.Ю., Абрамова Н.В., Блинова М.И. и др. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2013. Т. 172. № 1. С. 104–107.
3. Одинцова И.А., Данилов Р.К., Гололобов В.Г. и др. Морфология. 2014. Т. 145. № 3. С. 147–147а.

МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННЫЙ АНТИОКСИДАНТ ПОЛИОЛМЕТАНОФУЛЛЕРЕН СНИЖАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ *IN VITRO*

Г.Р. Шарапова¹, Н.В. Калачева¹, Г.М. Фазлеева², Л.Н. Исламова²

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

² Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

e-mail: s.g.raifovna@yandex.ru

Ключевые слова: полиолметанофуллерен, противоопухолевый антиоксидант, глиобластома, астроцитомы, OXPHOS, гликолиз.

Энергетический метаболизм в опухолевых клетках изменен по сравнению с нормальными клетками и, следовательно, может служить мишенью в противоопухолевой терапии. Биоэнергетический фенотип опухоли варьирует от гликолитического до окислительного и зависит от типа раковой опухоли, стадии рака и микроокружения опухолевых клеток. Наиболее агрессивные опухолевые клетки, в их числе клетки глиобластомы, характеризуются выраженным окислительно-восстановительным дисбалансом из-за повышенного гликолитического и митохондриального окислительного метаболизма. Окислительная активность раковых клеток и тканей обусловлена аномально высокими уровнями свободных радикалов [1]. Поэтому антиоксиданты могут играть ведущую роль в противоопухолевой терапии, подавляя трансдукцию сигналов, зависящую от свободных радикалов. В своей работе мы проанализировали энергетические профили 8 различных клеточных линий глиом, используя технологию Seahorse. Исследованные клеточные линии глиом проявляли энергетическую гетерогенность и имели разные уровни OXPHOS и гликолиза. Нами были отобраны две клеточные линии с различными энергетическими профилями — глиобластома A172 (высокие уровни OXPHOS и гликолиза) и астроцитомы U251 (низкий уровень OXPHOS и высокий уровень гликолиза). Изучено действие водорастворимого производного фуллерена C60 — полиолметанофуллерена C60[C9H10O4(OH)4]6 на выживаемость клеток этих линий (Crystal Violet method). Ранее нами было установлено, что полиолметанофуллерен проявляет свойства мягкого разобщителя OXPHOS [2] и избирательно снижает митохондриальный потенциал в клетках с гиперполяризованными митохондриями, включая опухолевые [3]. Кроме того, мы показали впервые, что это производное сохраняет антирадикальные свойства исходного фуллерена C60 (в реакции Фентона), то есть может быть ловушкой для свободных радикалов в клетке. Инкубация клеточных линий глиом с полиолметанофуллереном (100 и 200 μM) в течение 72 часов снижала выживаемость клеток глиобластомы в среднем на 38%, в то время как снижение выживаемости клеток астроцитомы не превышала 10%. Полученные результаты обосновывают дальнейшее изучение полиолметанофуллерена как перспективного антиоксиданта при опухолях с повышенным уровнем OXPHOS.

Литература:

1. Hayes J., Dinkova-Kostova A., Tew K. Cancer Cell. 2020. V. 38(2). P. 167–197.
2. Kalacheva N.V. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. V. 28(6). P. 1097–1100.
3. Tarasova G.R. et al. J. Human gene therapy. 2019. V. 30. A. 65.

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ СПИДРОИНОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

Р.В. Шариков^{1, 2}, Д.Р. Стрельцов^{1, 2}, С.Н. Малахов¹, Т.Х. Тенчурин¹, Л.И. Давыдова¹, В.Г. Богущ^{1, 2}, С.Н. Чвалун^{1, 2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

e-mail: Sharikov_RV@nrcki.ru

Ключевые слова: рекомбинантный спидроин, биополимеры, волокнистые материалы, структурные особенности, механические характеристики.

Нетканые полимерные материалы активно применяются в качестве укрывных, фильтрующих элементов в различных сферах деятельности. В медицине они активно используются в качестве повязок для лечения ран и ожогов, в том числе на основе синтетических полимеров. Однако большой интерес представляют природные полимеры на основе полисахаридов и белков, которые обладают уникальными биологическими и физико-механическими характеристиками [1]. На данный момент получение нетканых материалов из природных полимеров с регулируемой структурой и свойствами является по-прежнему актуальной задачей.

Одними из наиболее перспективных природных полимеров для получения материалов для биомедицины являются рекомбинантные белки спидроины [2]. Известно, что паутина обладает уникальными свойствами. Регулирование пауком аминокислотного состава спидроина позволяет изменять в большом диапазоне механические характеристики волокна, адгезию при сохранении биосовместимости [3]. Использование биохимических методов позволяет менять состав рекомбинантных белков спидроинов и регулировать не только физико-механические свойства, но и средство, и их пролиферативную активность к различным клеткам. Исследование вторичной структуры белка в материалах играет важную роль, так как его конформация непосредственно влияет на конечные свойства материала [4].

В данной работе были исследованы нетканые материалы, полученные методом электроформования из растворов рекомбинантных спидроинов rS1/9 и rS2/12 (аналоги белков шелка паука MaSp1 и MaSp2 соответственно) [5]. Определение механических характеристик отдельных нановолокон методом атомно-силовой микроскопии показало, что с увеличением диаметра волокна происходит резкое падение модуля упругости с последующим выходом на плато (с 80 до 10 ГПа). Причем регулирование параметров формования способно также приводить к изменению механических характеристик. Уменьшение механической прочности волокон с ростом диаметра связано с преобразованием надмолекулярной организации белков в толще волокон. Таким образом, регулируя параметры, можно добиться получения материала с заданными свойствами под конкретные задачи биомедицины. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Литература:

1. Mogoşanu G.D., Grumezescu A.M. *Int. J. Pharm.* 2014. V. 463. № 2. P. 127–136.
2. Debabov V.G., Bogush V.G. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. V. 6. № 7. P. 3745–3761.
3. Elices M., Guinea G. V., Plaza, G. R. et al. *Macromolecules.* 2011. V. 44. № 5. P. 1166–1176.
4. Tenchurin T.K., Sharikov R.V., Chvalun S.N. *Nanotechnol. Russ.* 2019. V. 14. № 7. P. 290–310.
5. Bogush V.G., Sokolova, O. S., Davydova, L. I. et al. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4. № 1. P. 17–27.

ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ КЛЕТочНОГО РОСТА

Н.А. Шарикова¹, К.И. Луканина¹,
С.Н. Малахов¹, С.В. Крашенинников¹,
П.М. Готовцев^{1,2}, Т.Е. Григорьев^{1,2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² НИУ Московский физико-технический институт,
Долгопрудный, Россия

e-mail: nata_glushkova@bk.ru

Ключевые слова: нетканые материалы, ацетат целлюлозы, технический углерод, электростимуляция.

С развитием тканевой инженерии меняются требования, применяемые к биоматериалам. Новое поколение материалов должно не только выступать в качестве матрикса для клеточной адгезии, но также ускорять процесс пролиферации клеток [1].

В настоящее время в литературе природные полимеры (хитозан, желатин, целлюлоза) являются широко используемыми для изготовления матриксов, благодаря таким свойствам как биосовместимость, биоразлагаемость и биоадекватность. Предполагается, что такие материалы выполняют роль временной подложки при естественном восстановлении тканей, не оказывая стимулирующего действия на пролиферацию и дифференцировку клеток [2].

Одним из наиболее перспективных методов, улучшающих регенерацию тканей, является электростимуляция. Использование данного метода с электропроводящими матриксами позволяет контролировать внешние параметры сигнала (продолжительность, интервал, интенсивность), а также совмещать с другими физическими и химическими методами стимуляции клеток [3]. Электростимуляция в сочетании с электропроводящими матриксами способствует усилению клеточной адгезии и пролиферации клеток эпидермиса, остеоцитов, нейрональных, мышечных клеток [2].

В данной работе представляется технология создания композиционных нетканых материалов методом электроформования на основе полимера ацетат целлюлозы. В качестве проводящих компонентов используются технический углерод (ТУ) и полимер PEDOT:PSS. ТУ непосредственно добавляли в полимерный раствор (концентрация до 10 масс.%), тогда как PEDOT:PSS вводили посредством пропитывания нетканых материалов.

Морфология полученных композитов была исследована методом сканирующей электронной микроскопии. Анализ физико-механических характеристик проводился на универсальной машине для испытаний на растяжение, а электропроводящие свойства измеряли четырехконтактным методом.

В работе показана оптимальная степень наполнения композитов (5 масс.%), при которой достигаются необходимая электропроводность ($3,1 \pm 0,1$ мСм) и прочностные свойства. Таким образом, полученные материалы пригодны для использования в качестве матриксов при электростимуляции. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Литература:

1. Sukmana I.J. *Artif. Organs.* 2012. V. 15. № 3. P. 215.
2. Marsudi M.A., Ariski R.T., Wibowo A. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 21. P. 11543.
3. Романов А.О. *Вестник ВИТ «ЭРА».* 2021. Т. 2. № 4. С. 15.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА С ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА TNFAIP3

**О.Н. Шевелева¹, Е.А. Протасова¹, Т.А. Ненашева¹,
Н.Н. Буторина¹, С.П. Медведев², Е.В. Григорьева²,
В.И. Мельникова¹, И.В. Лядова¹**

¹ ФГБНУ Институт биологии развития
им Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики
СО РАН, Новосибирск, Россия

e-mail: on_sheveleva@mail.ru

Ключевые слова: макрофаги, клетки с индуцированной плюрипотентностью, геномное редактирование, TNFAIP3.

Макрофаги — важнейшие клетки врожденного иммунитета, участвующие в формировании воспалительного и иммунного ответа, репарации ткани и поддержании гомеостаза. Они присутствуют во всех тканях организма и представляют собой привлекательную мишень для терапии различных заболеваний. Одной из важных задач клеточной терапии в настоящее время является получение генетически модифицированных макрофагов. Основная сложность в модификации макрофагов заключается в их невосприимчивости к генетическим манипуляциям и невозможности получения их из моноцитов периферической крови в достаточном количестве. По этой причине перспективным является подход, при котором модифицированные макрофаги (мод-МФ) получают *in vitro* из модифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (мод-иПСК). Целью настоящего исследования было получение мод-МФ из иПСК с управляемой экспрессией гена TNFAIP3, кодирующего белок A20, который принимает участие в ограничении воспалительного ответа и снижении клеточной гибели.

На первом этапе были получены мод-иПСК супрессимой доксициклином экспрессией TNFAIP3. За основу была взята линия иПСК, полученная из моноцитов крови в ИЦиГ СО РАН. Генетическая модификация осуществлялась электропорацией с применением CRISPR-Cas9. Полученные мод-иПСК.A20 были охарактеризованы по основным критериям плюрипотентных клеток: экспрессии щелочной фосфатазы и основных маркеров плюрипотентных клеток (OCT4, SOX2, NANOG) и способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков.

На втором этапе был отработан протокол получения из мод-иПСК.A20 мод-МФ.A20. Мод-МФ.A20 имели характерный фенотип, сходный с немодифицированными макрофагами (экспрессировали маркеры CD14, CD45, CD163, HLA-DR и др.), обладали фагоцитарной активностью и увеличивали экспрессию TNFAIP3 в 2–7 раз в присутствии доксициклина, что было подтверждено методом ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттингом и транскриптомным анализом.

Таким образом, в данной работе предложен эффективный и воспроизводимый протокол получения мод-МФ с управляемой экспрессией TNFAIP3, который использован нами для оценки противовоспалительной активности мод-МФ.A20, полезен для дальнейшего анализа роли TNFAIP3 в регуляции функции макрофагов, а также создает основу для получения других генетически модифицированных МФ человека. Работа осуществлялась при поддержке Минобрнауки РФ, проект

№ 075-15-2020-773. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

РОЛЬ КОНСТИТУТИВНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ

А.И. Шевченко, С.М. Закиян

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

e-mail: epigene@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: инактивация X-хромосомы, конститутивный гетерохроматин, длинные некодирующие РНК.

При исследовании трофобластных стволовых клеток полёвки и эмбриональных стволовых клеток человека обнаружено, что в процессе инактивации в ответ на экспрессию РНК гена Xist/XIST модификации из районов конститутивного гетерохроматина распространяются по инактивируемой X-хромосоме, формируя на ней домены, обогащенные триметилированным гистонем H3K9, белками HP1-гамма и KAP1, а также гистонметилтрансферазой SETDB1.

Распространение меток конститутивного гетерохроматина может сопровождаться утратой модификаций активного хроматина, инактивацией транскрипции X-сцепленных генов и поддержанием их транскрипционного сайленсинга. Мы предполагаем, что индуцируемое некодирующей РНК распространение репрессивных меток из районов конститутивного гетерохроматина может являться эволюционно исходным механизмом процесса инактивации у млекопитающих. Работа поддержана Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022–0015.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЛИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛУРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С МОНОГЕННЫМИ ФОРМАМИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**Д.М. Шимченко, Т.П. Герасимова,
И.А. Гривенников, С.А. Антонов, Л.В. Новосадова,
Е.Л. Арсеньева, В.З. Тарантул, Е.В. Новосадова**

Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

e-mail: shimchenko1211@mail.ru

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, глиальные клетки.

Болезнь Паркинсона (БП) — одно из наиболее распространенных неизлечимых нейродегенеративных заболеваний. Основными характерными чертами патогенеза заболевания являются прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов черной субстанции [1]. Важную роль в функционировании центральной нервной системы (ЦНС) играет нейроглия. Данная популяция клеток принимает участие в обмене нейротрансмиттеров, формировании и созревании синапсов, регуляции рН, водного и ионного гомеостаза и формировании гематоэнцефалического барьера. При патологических состояниях функция глии нарушается, астроциты активируют экспрессию воспалительных генов, участвуя в поддержании

нейровоспаления [2]. Для получения нейронов и глиальных клеток в настоящее время используют индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК) человека. Уникальность этого подхода состоит в том, что клеточный материал, полученный от пациентов с генетическими нарушениями, для получения ИПСК будет транскрибировать эти нарушения во все дифференцированные производные. Таким образом, можно изучать влияние определенной генетической мутации в разных клеточных популяциях, дифференцированных из одной и той же уникальной линии ИПСК.

Ранее нами был показан ряд изменений в профиле экспрессии большого количества генов в дофаминергических нейронах дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с разными мутациями, приводящими к БП [3].

В настоящей работе были получены глиальные культуры, дифференцированные из ИПСК пациентов с мутациями в генах GBA (глукосидараза), PARK2 (паркин) и LRRK2 (дардарин), приводящих к БП, и здоровых доноров. Полученные культуры клеток были охарактеризованы с помощью иммуноцитохимического анализа и ПЦР в реальном времени. Была обнаружена дифференциальная экспрессия ряда генов у здоровых доноров и у пациентов с БП. Показано, что в ответ на воспалительные стимулы глиальные клетки меняют экспрессию генов и секреторный профиль, тем самым проявляя свойства иммунокомпетентных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Литература:

1. Cookson M.R., Hardy J., Lewis P.A. International journal of clinical and experimental pathology, 2008.V. 1. P. 217–231.
2. Booth H., Hirst W.D., Wade-Martins R. Trends in neurosciences, 2017. V. 40. P. 358–370.
3. Novosadova E.V., Nenasheva V.V. et al. Journal of Molecular Neuroscience, 2020. V. 70. P. 514–521.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА NES В МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИЦАХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

**И.Н. Шипунова¹, А.И. Дорофеева¹,
Т.Ф. Савватеева², Л.А. Кузьмина¹,
Е.Н. Паровичникова¹**

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России,
Москва, Россия

² ГБОУ Московская школа на Юго-Западе № 1543,
Москва, Россия

e-mail: iranifontova@yandex.ru

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, колониобразующие единицы фибробластов, экспрессия генов, нестин.

Кроветворные микроокружение костного мозга (КМ) — это некроветворные клетки, необходимые для успешного функционирования стволовых клеток крови в течение всей жизни организма. Большую часть кроветворного микроокружения составляют стромальные клетки — потомки мезенхимной стволовой клетки (МСК). Иерархия стромальных предшественников охарактеризована скудно, in vivo выделяют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

(ММСК) и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф). МСК не имеют уникального сочетания поверхностных антигенов, что затрудняет их выделение в виде чистой популяции. Показано, что экспрессия нестина, изначально выявленная в нейральных предшественниках, характерна и для МСК. Часто экспрессия гена нестина (NES) используется в качестве маркера этих стромальных предшественников. Целью работы было оценить уровень экспрессии гена NES в ММСК и их потомках — КОЕф, а также выяснить, как изменяется этот показатель при переходе от олигопотентных клеток-предшественниц, способных к остеогенной и адипогенной дифференцировке, к монопотентным клеткам-предшественницам, способным осуществлять дифференцировку только в одну из указанных линий.

Из КМ 19 доноров (11 мужчин, 8 женщин, 29,5±2,7 лет) получали ММСК и КОЕф по стандартным методикам. Из ММСК и КОЕф выделяли РНК. Из тех же образцов КМ были получены индивидуальные клоны КОЕф. Для этого по 15 000 клеток КМ культивировали в лунках 96-луночной платы. Клетки из лунок, где был выявлен рост одного клона, по достижении конfluентности пересаживали в ячейки 6-луночной платы. Затем, конfluентную ячейку рассаживали на 3 и через 2–3 дня в 2 ячейки добавляли стандартные смеси индукторов костной и жировой дифференцировки. В 1 ячейке контрольные клетки культивировали в стандартной среде. Через 14 дней из клеток выделяли РНК. Ответ на индукторы дифференцировки определяли по изменению относительного уровня экспрессии (ОУЭ) маркерных генов (ALPL и PTHrP для остео- и FABP4 и PPAR γ для адипо- дифференцировок). ОУЭ маркерных генов и гена NES анализировали при помощи ПЦР в реальном времени. Было проанализировано 299 индивидуальных клонов КОЕф.

Оказалось, что средний ОУЭ NES достоверно не отличается в ММСК (0,41±0,13) и в суммарной популяции КОЕф (0,24±0,05). В индивидуальных клонах КОЕф ОУЭ был недостоверно выше, чем в суммарной популяции (0,31±0,04). При анализе КОЕф, различающихся по дифференцировочному потенциалу, наивысший ОУЭ гена NES выявлен в группе монопотентных остеогенных предшественников, тогда как в олигопотентных предшественниках его экспрессия была статистически достоверно ниже.

Итак, экспрессия гена NES в мезенхимных стромальных предшественниках из костного мозга не является специфичной для МСК и не может быть использована в качестве уникального маркера этого типа клеток. Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (проект № 22-15-00018).

ПЛАЦЕНТАРНЫЕ МАКРОФАГИ И ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ В УСЛОВИЯХ ЭНДОГЕННОГО ДИСБАЛАНСА БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

А.И. Шорников¹, Л.М. Меркулова²

¹ ФГБОУ ВО Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

² ФГБОУ ВО ЧГУ им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

e-mail: drsorn@mail.ru

Ключевые слова: беременность, биогенные амины, плацента, преэклампсия, макрофаги, тучные клетки.

Многие причины осложнений беременности основаны на факторах иммунобиологического взаимодействия на границе матка — плодное яйцо (плацента). Расшифровка механизмов регуляции этих взаимоотношений помогла бы решить проблемы в регенерационной медицине, в трансплантологии и в поиске методов лечения преэклампсии.

Иммуногистохимическими методами изучены особенности локализации в плаценте биогенных аминов (катехоламины, гистамин и серотонин), послынная топография макрофагов (CD-68) и тучных клеток (триптаза) при преэклампсии (ПЭ).

Исследованы 24 плаценты от родильниц, перенесших ПЭ. Контролем служили 8 плацент от женщин с физиологическим течением беременности и родов. Кусочки, вырезанные из материнского, среднего и плодного слоев плаценты, обработаны общепринятыми гистологическими и иммуногистохимическими методами для выявления вышеназванных веществ и клеточных структур.

Установлено, что гистамин, серотонин и катехоламины выявляются диффузно в структурах плаценты и более отчетливо в макрофагах (гранулярных люминесцирующих клетках). При ПЭ содержание биогенных аминов в плаценте превышает нормальные показатели в 1,6 раза. Одновременно выявляется дисбаланс содержания биогенных аминов между клеточными структурами и стромой.

При легкой ПЭ экспрессия CD68 в материнской части плаценты достоверно не отличается от нормы, но в плодной части и в среднем слое достоверно повышается, превышая нормальные показатели примерно в 1,5 раза. При тяжелом течении ПЭ экспрессия CD68 повышается 3,5 раза во всех слоях плаценты.

При физиологическом течении беременности выявляются единичные тучные клетки в строме и в межворсинчатом пространстве. Триптаза в норме выявлялась в синцитиотрофобласте, эндотелии капилляров, в строме ворсин хориона. При этом в межворсинчатом пространстве обнаруживались единичные триптазаположительные клетки.

При легком течении ПЭ экспрессия триптазы в структурах плаценты повышается и превышает норму более чем в 2 раза, а при тяжелом течении — экспрессия триптазы резко снижается и достоверно не отличается от нормальных показателей, но сопровождается появлением триптазы в межворсинчатом пространстве, что может свидетельствовать о срыве адаптационных возможностей матери и плода.

Выявленные особенности иммуногистохимических показателей в плаценте могут дать дополнительную информацию для расшифровки механизмов патогенеза преэклампсии.

ЧАСТИЧНОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ РЕВИТАЛИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.А. Шорохова¹, Ю.С. Иванова¹, Л.Л. Алексеенко¹, И.В. Кожухарова¹, Н.А. Пуговкина¹, А.П. Домнина¹, И.К. Кунеев^{1,2}, Т.М. Гринчук¹, О.Г. Люблинская¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

e-mail: o.lyublinskaya@mail.ru

Ключевые слова: МСК, мезенхимные стволовые/стромальные клетки, клеточное старение, ревитализация, частичное репрограммирование.

Поиск путей предотвращения старения культивируемых мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека (МСК) имеет как фундаментальное, так и прикладное значение, поскольку старение культур МСК препятствует внедрению в медицинскую практику клеточных продуктов, создаваемых на основе этих клеток. В данный момент мировым научным сообществом тестируется несколько стратегий замедления старения как на уровне клеток, так и на уровне организма в целом: модулирование сигнальных путей, ассоциированных с индукцией старения, элиминация стареющих клеток из популяции или из тканей организма с использованием сенолитиков, низкокалорийная диета и др. Однако, изучение процесса частичного репрограммирования клеток и возможностей с помощью этой технологии омолодить (ревитализировать) клетки и/или организм только начинается [1]. Примечательно, что наибольший успех в этой области был достигнут именно на моделях *in vivo*, тогда как клеточных работ в системе *in vitro* довольно мало, а полученные результаты иногда противоречивы. Настоящая работа направлена на изучение возможности ревитализировать постаревшие МСК эндометрия человека (эМСК) с применением техники частичного репрограммирования.

В своем исследовании мы оценили изменения, которые произошли после индукции репрограммирования в культурах эМСК, постаревших в результате длительного культивирования (35–40 пассажей). Проведенные тесты показали, что спустя 3–5 дней после начала репрограммирования с помощью Сендай вирусов, кодирующих факторы Яманаки (OSKM), эМСК сохраняли свой фенотип и характеризовались экспрессией поверхностных маркеров, типичных для МСК. В то же время, репрограммируемые клетки утратили черты постаревших: они изменили морфологию, утратили распластанность и уменьшились в размере; уменьшился сигнал автофлуоресценции, связанный с накоплением в постаревших клетках липофусцина; в ядрах исчезли разрывы ДНК; сократилось количество клеток, экспрессирующих галактозидазу, ассоциированную со старением; активизировались системы тиол-дисульфидного обмена, контролируемые клеточный редокс-метаболизм. В ревитализированных клетках изменилась активность маркерных генов клеточного старения: снизилась экспрессия p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, опосредующего блокирование пролиферации постаревших клеток; увеличилась экспрессия генов-участников ответа на повреждение ДНК (Chk1 и ATM), чья сниженная активность обеспечивает толерантность стареющих клеток к персистирующим разрывам ДНК; повысилась экспрессия генов, отвечающих за активизацию редокс-метаболизма клеток (TXN и PRDX1).

Таким образом, проведенные нами тесты выявили признаки ревитализации эМСК, наблюдаемые через 3–5 дней после индукции репрограммирования клеток. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-20122.

Литература:

1. Ocampo A., Reddy P., Martinez-Redondo P., et al. Cell 2016; V. 167. P.1719.

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ НАРКОЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗОФЛУРАНА НА ТРАНСКРИПТОМ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Я.Ю. Шпетко¹, И.Б. Филиппенков¹,
Ю.А. Ремизова¹, К.Д. Головина¹,
В.В. Ставчанский¹, А.Е. Денисова², Л.В. Губский^{2,3},
С.А. Лимборская¹, Л.В. Дергунова¹

¹ ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия

e-mail: yana.sch2014@yandex.ru

Ключевые слова: ишемический инсульт, tMCAO, изофлуран, длительность наркоза, подкорковые структуры мозга, транскриптомика, мРНК, сигнальные пути.

Ишемический инсульт (ИИ) — одно из наиболее тяжелых заболеваний мозга. При изучении механизмов патогенеза ИИ и нейропротекции используют модели ишемии лабораторных животных. Показано, что применение наркоза может влиять на формирование очага ишемического повреждения мозга. Однако характер вовлеченности генов и их активности при этом остается недостаточно изученным.

В работе была рассмотрена модель временной окклюзии правой средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс в 2 вариантах, отличающихся длительностью пребывания животных под наркозом. Был использован изофлуран (3%-индукция; 1,5%-поддержание), который часто применяется для ингаляционного наркоза и обладает нейропротективным эффектом. При tMCAO с «длинным» наркозом крысы находились под анестезией в течение операции и всего времени окклюзии (90 мин), а при tMCAO с «коротким» наркозом — только в течение операции по окклюзии сосуда и восстановлению кровотока. Через 24 ч после tMCAO по данным магнитно-резонансной томографии при «длинном» наркозе ишемический очаг затрагивал преимущественно область подкорковых структур мозга, тогда как при «коротком» наркозе очаг был более объемным и распространялся на прилегающую кору.

С помощью RNA-Seq мы сравнили профили экспрессии 17368 генов (мРНК) в подкорковых структурах мозга крыс, содержащих очаг ишемического повреждения, через 24 ч после tMCAO с «длинным» и «коротким» наркозами. Были выявлены 1245 общих генов (*Hspa1a*, *Ptx3*, *Atf3*, *Socs3* и др.), изменивших экспрессию (>1,5; *Padj* < 0,05) относительно соответствующих образцов мозга ложнооперированных крыс. Причем большинство общих генов сопоставлено изменили (преимущественно повысили) экспрессию в условиях обоих вариантов модели tMCAO. Также были найдены 694 (*S100a9*, *Slc5a3*, *Shbg*, *Egr4* и др.) и 1557 генов (*Kcnq3*, *Neurod2*, *Dok6*, *Wnk3* и др.), изменивших экспрессию через 24 ч после tMCAO только при «длинном» и «коротком» наркозах соответственно.

С помощью David 2021 было установлено 126 перекрывающихся метаболических путей (MAPK, TNF, cAMP и др.). Они характеризовали транскриптомный ответ в мозге крыс на ишемию вне зависимости от длительности наркоза. Более того, гены, повысившие экспрессию, были связаны с системами иммунного и воспалительного

ответов, в то время как понизившие — с нейросигнализацией. При этом большинству уникальных генов в модели tMCAO с «коротким» наркозом соответствовали сигнальные пути, относящиеся к нейротрансмиссии (Serotonergic synapse, GABA receptor activation, Axon regeneration и др.), а в варианте с «длинным» наркозом — воспалительному ответу (Cytokine, Interleukins, IL-5 и др.). Таким образом, были выявлены гены и сигнальные пути, которые отражают как общий эффект церебральной ишемии, так и воздействие изофлурана на формирование очага ишемического повреждения мозга. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00268-П.

ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

А.В. Шулепов¹, И.В. Шеладев¹, И.А. Одинцова²,
О.Е. Миргородская², М.И. Шперлинг²,
Ю.В. Юркевич¹, П.А. Романов¹

¹ ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

e-mail: soash@mail.ru

Ключевые слова: компрессионная травма, травматическая ишемия мышц, репаративная регенерация, скелетная мышца, воспаление.

Цель исследования — выявить динамику репаративных процессов на этапах заживления экспериментальной компрессионной травмы скелетных мышц.

Экспериментальными животными служили половозрелые крысы линии Вистар (n=38) массой 230–250 г и возрастом 3,5–3,6 мес. Все животные были распределены на основную группу (n=28), которым после обезболивания наносили компрессионную травму (КТ) задней конечности (сила компрессии — 10–12 кг/см², длительность сдавливания — 7 ч) и группу сравнения (n=10), в которую входили интактные (здоровые) крысы. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации. Забор материала производили на 3, 7, 14, 28 сут после нанесения КТ. Подготовку материала осуществляли в морфологической лаборатории, препараты окрашивали гематоксилином с эозином. Оценивали выраженность некроза, воспалительного процесса, грануляций, фиброза полукочественным морфометрическим методом при Ув. 400), где сильно выраженный признак обозначали (+++), слабо выраженный (+), отсутствие признака (0).

На 3-и сут после прекращения компрессии в исследуемых скелетных мышцах зафиксированы реактивные изменения тканевых структур, свидетельствующие о нарушении микроциркуляции и развитии ишемического некроза. Наблюдались локальные разрушения кровеносных сосудов, агрегация форменных элементов крови в их просвете. Морфометрические показатели 3 сут: некроз (++), воспаление (+), грануляции (0), фиброз (0). На 7-е сут определялась гибель мышечных волокон и фибробластов, отмечалось формирование лейкоцитарного вала. На месте разрушенных мышечных волокон происходило образование грануляционной ткани. Морфометрические показатели 7 сут: некроз (++), воспаление (+++), грануляции (+), фиброз (0). На 14-е сут

наблюдалось формирование мышечно-соединительнотканного регенерата с единичными очагами некроза. Морфометрические показатели 14 сут: некроз (+), воспаление (+++), грануляции (+++), фиброз (+). На 28-е сут сохранялись очаги некроза мышечной ткани, но их площадь была существенно меньше, чем в предыдущем сроке наблюдения. В составе мышечно-соединительнотканного регенерата выявлялось увеличение количества молодых новообразованных миосимпластических структур, среди которых преобладают мышечные трубки. Морфометрические показатели 28 сут: некроз (+), воспаление (+), грануляции (+), фиброз (+++).

Таким образом, динамические процессы, происходящие в скелетной мышце после нанесения компрессионной травмы, включают в себя не только некроз и воспалительную реакцию, но и пролиферацию камбиальных источников развития тканей, их дифференцировку и адаптивные изменения тканевых структур, приводящие к формированию мышечно-соединительнотканного регенерата. Динамика гистоморфологических признаков раневого процесса характеризовалась активацией воспалительного процесса с последующим преобладанием регенеративной активности тканей и формированием рубца.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОЗА В КУЛЬТУРЕ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

**И.А. Шурыгина¹, И.С. Трухан¹,
Н.Н. Дремина¹, М.Г. Шурыгин¹**

¹ *ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия*

e-mail: shurygina@rambler.ru

Ключевые слова: фибробласт, фактор роста фибробластов, апоптоз, bFGF, Bcl-2.

Основной фактор роста фибробластов (bFGF) является важным регулятором, влияющим на фазы воспаления, развитие фиброза [1–4]. Целью данной работы является изучение воздействия bFGF на культуру перитонеальных фибробластов крысы и содержание в клетках антиапоптотического белка Bcl-2.

Получали культуру фибробластов из сальника взрослой крысы линии Wistar после третьего пассажа обрабатывали bFGF в концентрации 133 пг/мл. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся воздействию фактора роста. Проводили флюоресцентное окрашивание с использованием антител к Bcl-2 (Cat. 1017-S, Epitomics), вторичных антител Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Cat. A-11034). Для визуализации использовали BioStation CT 4.1, Nikon.

При воздействии bFGF на культуру перитонеальных фибробластов наблюдалось интенсивное разрушение коллагена, округление и открепление фибробластов от субстрата и образование крупных конгломератов, состоящих из нескольких десятков клеток, соединенных коллагеновыми волокнами. Иммунофлюоресцентный анализ содержания в исследуемых клетках белка Bcl-2, модулирующего чувствительность клеток к проапоптотическим сигналам и, соответственно, влияющего на способность клеток выживать в изменяющихся условиях [5], показал более интенсивную, структурированную окраску Bcl-2 в контрольной группе, тогда как клетки, подвергнутые воздействию bFGF, характеризовались более бледной и неравномерной окраской. Статистический анализ

полученных данных также подтвердил достоверное снижение средней интенсивности флюоресценции после воздействия фактором роста на фибробласты, что может быть связано как с регуляцией апоптоза под действием bFGF. В исследовании использовали оборудование центра коллективного пользования «Диагностические изобретения в хирургии».

Литература:

1. Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А. и др. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2005. Т. 44. № 6. С. 199..
2. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2007. Т. 58. № 6. С. 169.
3. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Пат. физиология и эксперим. терапия. 2010. № 4. С. 34.
4. Shurygina I.A., Rodionova L.V., Ayushinova N.I. et al. Pleura and Peritoneum. 2020. V. 5. N 4. P. 20200114.
5. Shurygina I.A., Aushinova N.I., Shurygin M.G. International Journal of Biomedicine. 2018. V. 8. N 4. P. 342.

РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЗОНЕ ЛАМИНЭКТОМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**И.А. Шурыгина, О.А. Гольдберг,
А.П. Животенко, В.А. Сороковиков**

ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия

e-mail: shurygina@rambler.ru

Ключевые слова: ламинэктомия, эпидуральный фиброз, твёрдая мозговая оболочка, репаративный процесс, эксперимент.

Послеоперационный эпидуральный фиброз является важной причиной неудовлетворительных результатов хирургического лечения патологии позвоночника [1]. Цель исследования: оценить репаративные процессы в зоне ламинэктомии в различных анатомических зонах.

Изучен материал 24 крыс Wistar на 3-7-14-28-106 сутки после ламинэктомии на уровне LVI [2]. Образцы костной ткани декальцинированы оригинальным способом [3]. Топографоанатомически в ране выделены два отдела: эпидуральный, обнажённый после ламинэктомии, и культя дуги и оснований задних суставных отростков LVI. На 3 сутки в эпидуральном отделе при воспалении с преобладанием фибрина в экссудате развивается грануляционная ткань. В области резецированной дуги и суставных отростков на 3 сутки с их внешней стороны на костной ткани периост формирует минерализованный костный матрикс – остеоид и участки хондроиды с последующим энхондральным окостенением. Формируются первичные костные мозоли путём прямого и энхондрального остеогенеза. Рост мозолей распространяется на торцы резекции костей, формируя культы из губчатой костной ткани. На 28 сутки новообразованная соединительная ткань в виде единого блока занимает эпидуральное пространство и дозальные отделы сформированных культей. Эти структуры прослежены до 106 суток.

Таким образом, соединительная ткань в процессе заживления операционной раны в зоне ламинэктомии LVI объединяет два отдела, связанных с твердой мозговой оболочкой и резецированными дугами и задних суставных отростков. Процесс формирования соединительной ткани имеет свои особенности [4, 5]. В данной анатомической области совокупность репаративных процессов представляет единый комплекс и расширяет

морфологическое (анатомическое и гистологическое) представление об эпидуральном фиброзе. В исследовании использовали оборудование центра коллективного пользования «Диагностические изображения в хирургии».

Литература:

1. Животенко А.П., Гольдберг О.А., Сороковиков В.А. и др. Современные проблемы науки и образования. 2019. № 4. С. 60.
2. Гольдберг О.А., Животенко А.П., Самойлова Л.Г. и др. Acta Biomedica Scientifica. 2020. Т. 5. № 6. С. 259.
3. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Способ приготовления препарата костной ткани и набор для его осуществления. Пат. РФ № 2500104, кл. А01N 1/02, G01N 1/28. 2013.
4. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I. et al. Front. Chem. Sci. Eng. 2012. V. 6. N 2. P. 232.
5. Животенко А.П., Шурыгина И.А., Кошкарёва З.В. и др. Современные проблемы науки и образования. 2020. № 4. С. 151.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ КАВЕОЛИНА В ЭПИДЕРМИСЕ ПРИ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

**И.А. Шурыгина, И.С. Трухан,
Н.Н. Дремина, М.Г. Шурыгин**

*ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии
и травматологии, Иркутск, Россия*

e-mail: shurygina@rambler.ru

Ключевые слова: кавеолин, эпидермис, регенерация, рана.

Кавеолины — мембранные белки, участвующие в формировании липидных рафтов и кавеол плазматической мембраны, структур, ответственных за процессы клатрин-независимого эндоцитоза, трансдукцию сигналов и липидный обмен. Уровень экспрессии кавеолинов варьирует в разных тканях. Предполагается, что кавеолин-1 играет важную роль в регенерации тканей, однако по разным сообщениям эта роль может быть отрицательной или положительной в зависимости от типа ткани и характера процесса восстановления.

Цель исследования: изучить изменение экспрессии кавеолина 1 в клетках эпидермиса в условиях моделирования кожно-мышечной раны.

Материалы и методы: Кожно-мышечную рану моделировали с использованием крыс линии Wistar. Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 2 часов до 30 суток. Иммуногистохимические исследования тканей проводили по описанной ранее методике [1–3] с применением первичных моноклональных антител, специфичных к кавеолину 1 (Caveolin 1 Monoclonal Antibody (7C8), Cat. No MA3-600, Invitrogen) и вторичные антитела Alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Cat. No A11031, Invitrogen). Исследование одобрено комитетом по этике.

Результаты: Отмечено повышение уровня экспрессии кавеолина в сроки от 1 до 7 суток, предшествующих и совпадающих с активным пролиферативным и регенеративным процессами в области раны. Снижение экспрессии к 14 суткам эксперимента, характеризующихся формированием рубцовой ткани, свидетельствует о том, что данный белок играет существенную роль в регуляции физиологических процессов заживления ткани после механическом повреждении. В исследовании использовали оборудование центра коллективного пользования «Диагностические изображения в хирургии».

Литература:

1. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I. et al. Frontiers of Chemical Science and Engineering. 2012. V. 6. N 2. P. 232.
2. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Granina G.B., Zelenin N.V. Journal of Regenerative Medicine & Tissue Engineering. 2013. V. 2.
3. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. V. 158. N 4. P. 528.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АДИПОЦИТОВ ЗТЗ-L1 С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/i

**А.Д. Юдаева¹, С.С. Мичурин^{2,3}, Ю.С. Стафеев²,
М.Ю. Меньшиков², Е.В. Парфёнова^{2,3}**

¹ *Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия*

² *ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России,
Москва, Россия*

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

e-mail: aleksa.yudaeva@gmail.com

Ключевые слова: CRISPR*i*, бакуловирус, генная терапия, бежевая дифференцировка, термогенез.

Ожирение является широко распространённым заболеванием в мире. Индукция бежевой дифференцировки и изменение метаболизма белой жировой ткани могут иметь большой потенциал для лечения метаболических нарушений. Канонический механизм термогенеза в адипоцитах осуществляется за счет активности разобщающего белка митохондрий UCP1, рассеивающего энергию протонного градиента в виде тепла. Кроме активности UCP1, важную роль в термогенезе играют метаболические пути, снабжающие митохондрии энергией. В нашей работе мы разрабатываем систему для изменения экспрессии генов, являющихся регуляторами липогенеза (SREBP1c, ChREBP1b), липолиза (ATGL, Ces1d, GOs2), окисления жирных кислот (PPARα, PGC1α), генов, чья экспрессия способствует бежевой дифференцировке и термогенезу (PGC1α, UCP1). Регуляция экспрессии указанных белков позволит разработать более эффективные подходы для получения термогенных адипоцитов и дальнейшего их использования в борьбе с ожирением.

В нашей работе мы использовали систему регуляции транскрипции CRISPR*a*/i (CRISPR activation/interference), которая состоит из деактивированной нуклеазы Cas9 (dCas9), геновой РНК со шпильками, рекрутирующими комплекс активаторов транскрипции MCP-p65-HSF1 или комплекс ингибиторов транскрипции Com-KRAB к промоторам целевых генов. Подбор генов РНК осуществляли с помощью интернет ресурса <https://www.benchling.com>. Для доставки генетических конструкций использовались бакуловирусные частицы. Полученные конструкции использовали для трансдукции зрелых адипоцитов ЗТЗ-L1. Эффективность регуляции экспрессии целевых генов оценивали на 3 и 5 день после трансдукции методом ПЦР в реальном времени.

В результате были созданы бакуловирусные вектора для активации экспрессии генов UCP1, Ces1d, PPARα, PGC1α, ChREBP1b, SREBP1c, ATGL и для ингибирования GOs2 и Ces1d. После применения системы CRISPR*a*/i на адипоцитах ЗТЗ-L1 наблюдалось увеличение экспрессии мРНК UCP1 более чем в 40 раз, а также 2-кратное повышение экспрессии SREBP1c. В остальных случаях бакуловирусная трансдукция не оказывала

влияния на экспрессию целевых генов. При добавлении в качестве контроля вектора, содержащего только dCas9 и домены активации или ингибирования транскрипции, наблюдалось незначительное снижение экспрессии генов, что вероятно связано с ингибирующим действием самого dCas9.

Таким образом, в результате применения системы CRISPRa/i возможна индукция UCP1-зависимого термогенеза в адипоцитах за счет ко-активации транскрипции генов UCP1 и SREBP1c. Увеличение экспрессии разобщающего белка митохондрий UCP1 вероятно приведет к увеличению расхода энергии за счет использования в качестве субстрата свободных жирных кислот. Регуляция липогенеза активированным транскрипционным фактором SREBP1c может способствовать восполнению запаса жирных кислот, используемых в термогенезе.

ПРИМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, В ТЕРАПИИ НЕФРОТУБЕРКУЛЕЗА

Н.М. Юдинцева¹, М.Г. Хотин¹, М.А. Шевцов¹, М.И. Сулацкий¹, Д.Ф. Гончарова¹, Т.И. Виноградова², А.Н. Муравьев², А.Н. Ремезова², М.З. Догондзе², Н.В. Заболотных², М.Е. Дьякова², Д.С. Эсмедляева², И.А. Гарапач², О.С. Маслак², Н.А. Михайлова¹

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: yudintceva@mail.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, внеклеточные везикулы, бесклеточная терапия, нефротуберкулез.

Благодаря уникальным свойствам мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются привлекательными в различных областях регенеративной медицины. Терапевтический потенциал МСК связан с антибактериальной, иммуномодулирующей активностью клеток, способностью восстанавливать альвеолярный эпителий и поврежденные ткани легких [1]. Терапевтические эффекты МСК связывают с паракринной активностью и секретомом, который состоит из внеклеточных везикул (ВВ), белков, цитокинов и ростовых факторов [2]. Благодаря способности преодолевать большие расстояния и биологические барьеры, ВВ играют важную роль при осуществлении бесклеточной терапии, позволяют решить проблемы клеточной терапии, такие как изменчивость, неконтролируемое деление и загрязнение онкогенными клетками.

В работе оценивали терапевтическую эффективность ВВ в комплексной противотуберкулезной терапии (ПТТ) нефротуберкулеза (НТб) кролика. НТб моделировали в введении штамма *M. tuberculosis* H37Rv в корковый слой паренхимы почки. Контроль развития НТб подтверждали результатами Диаскинтеста, данными биохимического исследования и компьютерной томографии (КТ). Исследовали три группы животных: контроль заражения (без ПТТ); контроль лечения (ПТТ); экспериментальная группа (ПТТ+ВВ). ВВ вводили в краевую вену уха кролика в объеме 1 мл с концентрацией белка 10 мкг/мл. Параметры и содержимое ВВ анализировали с помощью

ТЭМ и протеомного анализа. Терапевтическую эффективность ВВ оценивали через 1 мес после введения с помощью гистологического, биохимических методов и КТ.

Применение ВВ в комплексной ПТТ приводило к снижению активности и распространенности специфического воспаления в почках, уменьшению фиброзных изменений и ускорению репаративной реакции организма с формированием зрелой соединительной ткани. Таким образом, бесклеточная терапия представляется перспективным направлением в комплексном лечении НТб. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-58-45012 и Государственного задания № 0103-2019-0012.

Литература:

1. Zhang X., Xie Q., Ye Z. et al. *Frontiers in Immunology*. 2021. V. 12.
2. Crivelli B., Chlapanidas T., Perteghella S. et al. *J. Control. Release*. 2017. V. 262. P. 104.

ОЦЕНКА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК КАК МАРКЕРА АНЕУПОИДИЙ ПЛАЦЕНТАРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

В.В. Юницкая¹, Т.А. Мараховская^{1,4}, О.И. Боровикова², И.Б. Васина², Н.Э. Скобликов^{1,3,5}

¹ ООО «СП МедикалГрупп», Краснодар, Россия

² ООО «ОКСИ-центр», Краснодар, Россия

³ ФГБНУ КНЦЗВ, Краснодар, Россия

⁴ Академия биологии и биотехнологии, ЮФУ, Ростов-На-Дону, Россия

⁵ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

e-mail: yunitskaya96@mail.ru

Ключевые слова: ткани плаценты, мозаицизм, НИПТ, секвенирование, геномика.

В отличие от большинства соматических органов и тканей, плацента стала объектом исследования специалистов по клеточным технологиям и регенеративной медицине относительно недавно: трофобластный органоид был получен лишь в ноябре 2018 года [1]. Важность исследований именно провизорных органоидов очевидна. В то же время, исследователи, работающие в данном направлении, будут сталкиваться с проблемой проявления геномного непостоянства органоидов, приводящего к появлению клеточных линий, характеризующихся анеуплоидным набором хромосом. Возможно, для специалистов данной области будет полезен опыт лабораторной диагностики и клинического наблюдения случаев плацентарной анеуплоидии (ограниченного плацентарного мозаицизма), выявленной по результатам геномных исследований.

В отделе геномной диагностики лаборатории «CL» исследовано 638 образцов крови беременных женщин в рамках проведения НИПТ — «неинвазивного пренатального тестирования», являющегося скрининговым методом выявления анеуплоидий плода на раннем сроке беременности. В рамках теста анализируют количество фрагментов свободно циркулирующей внеклеточной ДНК (сцвДНК) плода относительно материнской сцвДНК, выделяемой из плазмы венозной крови беременной женщины. Исследование сцвДНК NIPT SAGE (Yougene Health) проводилось методом полупроводникового секвенирования на платформе IonS5 со станцией пробоподготовки IonChef (Thermo Fisher Scientific).

Количество сцвДНК по каждой хромосоме выражалась через статистический показатель «Z-score», отражающий риск анеуплоидии: чем больше его отклонение от нулевого значения, тем более выражена вероятность анеуплоидии. Референсный интервал значения Z-score для аутосом составляет от $-6,0$ до $2,8$.

Нами выявлены два случая, которые могут быть охарактеризованы как ограниченный плацентарный мозаицизм. В обоих случаях при геномном анализе сцвДНК пациенток по результатам проведения НИПТ были получены значения показателя Z-score по 18-й хромосоме, которые значительно превосходили референсные ($15,31$ и $27,61$ соответственно), что свидетельствовало о высоком риске трисомии по 18-й хромосоме.

Следует учитывать, что исследуемая в рамках НИПТ сцвДНК поступает в кровотоки матери не столько от тканей самого плода, сколько из тканей плаценты. По этой причине результат анализа сцвДНК, полученный в рамках НИПТ требует обязательного подтверждения сочетанным анализом тканей плаценты и плода, полученных в результате инвазивного вмешательства. При проведении дополнительного инвазивного исследования амниотической жидкости, пуповинной крови и ворсин хориона в обоих случаях была подтверждена анеуплоидия (трисомия по 18-й хромосоме) клеток ворсин хориона при отсутствии признаков анеуплоидии в пуповинной крови, полученной при кордоцентезе. При проведении УЗИ на сроках 13 и 20 недель врожденные пороки развития плода не были обнаружены у обеих пациенток.

Полученные результаты были расценены как проявление ограниченного плацентарного мозаицизма, который характеризуется наличием клеток с аномальным хромосомным набором в плаценте при нормальном кариотипе плода [2–4]. Частота выявления такого состояния невелика [5]. Однако трисомия клеток плаценты является риском потери беременности, поэтому ведение таких пациенток должно осуществляться по специальному протоколу, направленному на сохранение беременности. В обоих случаях женщин вели как беременных с трисомией по 18-й хромосоме в плаценте. В результате в обоих описанных нами случаях родились в срок здоровые дети без клинических и лабораторных признаков анеуплоидий.

Возможно, предоставленная информация будет важна для специалистов, работающих в области геномных и клеточных технологий, а также для разработчиков аналитических систем геномного секвенирования. Динамический анализ внеклеточной ДНК в культуральных жидкостях *in vitro* может использоваться как инструмент в работе с клеточными линиями и при выращивании органоидов (не только плаценты).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда и ООО «СЛ МедикалГруп» в рамках научного проекта МФИ-П-20.1/10, а также при финансовой поддержке РФФИ и Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-230040-р_а.

Литература:

1. Turco M.Y., Gardner L., Kay R.G. et al. *Nature* (2018). V. 564. P. 263–267.
2. Yang J., Qi Y., Guo F. et al. *Mol. Cytogenet.* (2017). V. 10. P. 1–4.
3. Барков И.Ю. Совершенствование системы пренатального скрининга анеуплоидий плода внеклеточной крови ДНК матери на основе анализа. Диссертация на соискание степени к.м.н. Москва, 2018. 151 с.
4. Li X. et al. *Medicine* (2020). V. 99(29).
5. Hayata K. et al. *Acta Medica Okayama* (2017). V. 71. P. 181–185.

КЛЕТочная ИММУНОТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Г.М. Юсубалиева^{1,2}, С.В. Кулемзин³,
А.А. Калинин¹, П.А. Мельников^{1,4},
М.В. Ширманова⁵, В.В. Белоусов⁶,
В.П. Баклаушев^{1,2,7}

¹ ФНКЦ (ФНКЦ) ФМБА России, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Москва, Россия

⁴ НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава РФ, Москва, Россия

⁵ Приволжский национальный исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, Россия

⁶ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

⁷ НИИ пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

e-mail: gaukhar@gaukhar.org

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия, солидные опухоли, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, TILs, PD-1.

В экспериментах *in vitro* на опухолевых сфероидсах и *in vivo* — на модели ортотопической глиобластомы оценивали противоопухолевую эффективность опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (TIL), NK-клеток из пуповинной крови и модифицированных/таргетированных NK клеток линии YT (VAV1+, CISH-/-, B2M-/-, EGFRvIII-CAR, IL13-Her2-CAR). TILs получали из интраоперационного опухолевого материала пациентов, получавших хирургическое лечение мультиформной глиобластомы в ФНКЦ ФМБА России. Для визуализации клеток в экспериментах *in vitro* и *in vivo* применяли бицистронные лентивирусные векторы для одновременной экспрессии флуоресцентного белка mKate2 и люциферазы Luc2. В выделенных TILs с помощью проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав: доли цитотоксических CD8+ T-клеток (CTL), CD4+ T-хелперов, CD4+CD25+, FoxP3+ T регуляторных клеток, CD56+ NK, CD56+CD3+ NKT, CD19+ B-клеток до и после активации. Взаимодействие иммунных клеток с опухолевыми клетками в экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучали с помощью интравитальной конфокальной микроскопии и метаболического биоимджинга.

Было обнаружено, что исходные культуры TIL характеризовались высоким уровнем экспрессии PD1, низким относительным содержанием CD8+ CTL и, наоборот, высоким содержанием CD4+CD25+CD127-FoxP3+ иммуносупрессивных T-регуляторных клеток. Разработанный нами модифицированный протокол активации в среде, содержащей комбинации IL-2/IL-15/IL-21/IL-7, анти-CD3, анти-CD28, анти-CD137 и анти-PDL1-антитела позволяет получить клеточный препарат, содержащий до 95% CD8+ PD1- активированных CTL в количестве, достаточном для проведения адаптивной терапии (5×10^8 и более). В экспериментах *in vitro* активированные TIL так же, как пуповинные NK клетки и модифицированные YT клетки способны мигрировать внутрь сфероида глиобластомы человека, разрушая его, приводя к метаболическим нарушениям и апоптозу опухолевых клеток.

На сингенных ортотопических моделях GL-261 и ST-2A глиобластомы мыши изучали межклеточное взаимодействие аутологичных мышинных TIL с клетками глиомы, а также особенности иммуносупрессивного опухолевого

микроокружения. С помощью интравитальной микроскопии показана миграция флуоресцентно-меченных TIL и опухоль-ассоциированных МСК в очаг солидной опухоли. Полученные результаты могут лечь в основу новых технологий адоптивной иммунотерапии солидных опухолей, преодоления иммуносупрессивного микроокружения и дальнейших модификаций иммунных клеток, усиливающих их противоопухолевую активность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда № 21-74-20110 и № 22-64-00057.

НАРУШЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ И ИХ МИКРООКРУЖЕНИЯ КАК ОСНОВА ПАТОЛОГИИ

Б.Г. Юшков

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия*

e-mail: b.yushkov@iip.uran.ru

Ключевые слова: стволовые клетки, микроокружение, патология.

В последние годы все больше внимания привлекает проблема взаимоотношения клеток-предшественниц с их микроокружением. Считается, что активность стволовых клеток подлечит не клеточно-автономной регуляции из локального микроокружения или «ниши». Вместе с тем, не только микроокружение влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток, но и последние могут оказывать влияние на формирование нужного им микроокружения.

Физиологическая ниша состоит из различных тканевых компонентов, клеточных популяций (фибробласты, макрофаги, тучные клетки, Т-лимфоциты) и растворимых факторов, которые жестко регулируют поведение стволовых клеток.

Исследования при экстремальных состояниях свидетельствуют об изменении в экстрацеллюлярном матриксе соотношения между гликопротеидами и кислыми ГАГ. Последние выступают в качестве факторов, блокирующих или запускающих механизмы митоза. При иммобилизационном стрессе в экстрацеллюлярном матриксе костного мозга снижается концентрация глюкозы, что предотвращает репликативное старение, усиливает митохондриальное дыхание в мезенхимальных стволовых клетках человека. Кроме того, снижаются концентрации ЛДГ, щелочной и кислой фосфатаз и возрастают концентрации холестерина, триглицеридов и фосфора, изменяется характер образуемых таким матриксом кристаллов. При воспалении в межклеточной среде костного мозга повышается концентрация витаминов В1, В2, В12, РР, С и падает В6.

В результате перестройки микроокружения может исчезнуть «ниша» резидентной стволовой клетки, что дает основание ввести термин «мигрирующая ниша», который хорошо объясняет феномен «клональной сукцессии». Некоторые авторы считают предпочтительным использование термина «непрерывное высвобождение стволовых клеток для дифференцировки».

Патология взаимодействия может быть результатом поражения самих стволовых клеток или дефекта микроокружения. При этом нормальные ССК животных с врожденным дефектом микроокружения могут

компенсировать дефект ССК, что показано на примере кроветворной ткани, сперматогенеза, развития молочной железы.

Признание нарушений микроокружения в патогенезе заболеваний требует разработки методов целенаправленной их коррекции путем модулирования микроокружения. В качестве примера можно привести направленную на фибробласты терапию при раке молочной железы, предлагаемую Ashleigh Unsworth et al.

ДВУХВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ

И.А. Яковлев^{1,2}, А.М. Емелин³, И.С. Лимаев³, О.Н. Чернова³, М.О. Мавликеев³, В.О. Солдатов⁴, А.В. Дейкин⁴, М.В. Корокин⁴, М.В. Покровский⁴, А.А. Ризванов⁵, Р.В. Деев^{1,3}, А.А. Исаев¹

¹ ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

² ООО «Генотаргет», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ НИУ Белгородский государственный университет, Белгород, Россия

⁵ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: ivan@ivan-ya.ru

Ключевые слова: адено-ассоциированный вирус, миодистрофия, дисферлинопатия, генная терапия, регенерация мышечной ткани.

Дисферлинопатия — орфанное фенотипически генетическое заболевание, вызываемое патогенными вариантами в гене *DYSF*, и нарушении синтеза трансмембранного белка дисферлина, одной из главных функций которого является участие в репарации дефектов клеточных мембран мышечных волокон (МВ). Неуклонное развитие дисферлинопатии приводит к тяжелой инвалидности в трудоспособном возрасте. На сегодняшний день не существует одобренных методов этиопатогенетического лечения дисферлинопатии.

Для реализации генотерапевтического подхода к лечению дисферлинопатии был использован аденоассоциированный вирус (ААВ) 9 серотипа. Для доставки кодон-оптимизированного гена дисферлина, размер которого превышает лимит ёмкости ААВ, была использована двухвекторная система, в которой 2 вируса несли 2 части кДНК дисферлина (AAV9.DYSF). Эксперимент проводился на трансгенных мышцах B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ Bla/J. В 1 группе 12 самцам линии Bla/J была выполнена внутривенная инъекция вируса, забор биоматериала на 3, 6 и 12 недель. Во 2 группе выполнялось внутримышечное введение (в 3 дозировках) и внутривенное введение (в 1 дозировке), забор биоматериала через 3 недели. Для оценки влияния трансгенного дисферлина на состояние мышечной ткани были выполнены: ПЦР-РВ для количественной оценки копий ДНК и РНК, иммунофлуоресцентные реакции с диагностическими антителами, окраска гематоксилином и зозином для оценки морфометрических показателей. Во всех группах определен продукт иммунофлуоресцентной реакции, свидетельствуя о выработке дисферлина как минимум до 12 недель. В группе 2 количество дисферлин-позитивных МВ зависело от количества введенного ААВ. Таким

образом, AAV9.DYSF обеспечивает продукцию дисферлина *de novo*, характеризующегося мембранным и цитоплазматическим расположением в инфицированных МВ, что соответствует локализации этого белка в МВ здоровых мышей. Результаты морфометрического исследования в группе 1 показали, что введение AAV9.DYSF проявляется статистически значимым уменьшением доли некротизированных МВ и повышением регенераторной функции скелетных мышц (увеличением доли ЦЯМВ, снижением средней площади поперечного сечения).

AAV9.DYSF может рассматриваться как кандидат в препараты для лечения дисферлинопатии. Проводятся расширенные исследования для оценки влияния AAV9.DYSF на физиологические показатели, оценки безопасности препарата. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2021-1346.

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

И.В. Яминский^{1,2}

¹ *Физический и химический факультеты МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Центр перспективных технологий, Москва, Россия*

e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сканирующая капиллярная микроскопия, опухолевые клетки, клетки крови, нейроны, 3D визуализация.

Методы сканирующей зондовой микроскопии — атомно-силовая микроскопия и сканирующая капиллярная микроскопия — превратились в информативный инструмент, позволяющий получать трехмерные изображения клеток и клеточных структур с точностью до единиц нанометра и измерять локальные механические, физико-химические и электрофизиологические свойства клеток [1,2].

На примере наблюдений клеток крови, нейронов, эпителиальных клеток, опухолевых клеток продемонстрированы возможности атомно-силовой и капиллярной микроскопии при детальном исследовании морфологии и локальных свойств образцов. Показано, что сканирующая капиллярная микроскопия позволяет с помощью химически модифицированного капилляра реализовать биохимический наносенсор на активные формы кислорода и провести измерения их концентрации как вблизи мембраны клетки, так и внутри её. Рассмотрены возможные решения биосенсора на различные мишени при анализе единичных живых клеток. Представлен краткий обзор по использованию сканирующей капиллярной микроскопии для 3D печати биологическими молекулами.

Детально рассмотрены новые режимы сканирующей зондовой микроскопии, позволяющие максимально уменьшить воздействие на клетку при измерениях, как на воздухе, так и в жидкости. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества (проект № 21-58-10005), Фонда содействия инноваций (проект № 71108).

Литература:

1. Akhmetova A.I., Gukasov V.M., Rybakov Y.L., Yaminsky I.V. *Bio-Medical Engineering*. 2021. N 54(6). P. 434.
2. Яминский И.В. *Наноиндустрия*. 2021. Т. 14. № 2. С. 136.

НАРУШЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРИ АПЛАЗИИ МАТКИ И ПОИСК ПУТЕЙ ИХ КОРРЕКЦИИ МЕТОДАМИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Н.К. Ярыгина^{1,3}, **В.В. Бурунова**¹, **А.М. Гисина**¹, **К.К. Сухинич**^{1,2}, **З.Н. Макиян**³

¹ *ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

² *ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

³ *ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва, Россия*

e-mail: n.yarygina17@yandex.ru

Ключевые слова: клеточная дифференцировка, маркеры эмбриональных клеток, врожденные дефекты развития, Oct-4, Nanog, SSEA-4.

Врожденные дефекты развития представляют собой серьезную медицинскую проблему, которую современная медицина пытается решить хирургическими методами. Одним из ключевых элементов патогенеза врожденных дефектов является аномальное поведение стволовых (СК) и прогениторных (ПК) клеток, что приводит к дефектному гистогенезу и морфогенезу. В нормальном пренатальном онтогенезе зачатки органов содержат большое количество плюрипотентных СК, экспрессирующих Oct-4, Nanog и другие транскрипционные факторы, активно экспрессируемые эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК), а также другие характерные для ЭСК белки, в частности, мембранный белок SSEA-4. Позже количество таких клеток сокращается и взрослая ткань состоит в основном из паренхимы, стромы и небольшого количества мультипотентных «региональных», не экспрессирующих эмбриональные белки СК, находящихся в специальном тканевом компартменте, «стволовой нише», и обеспечивающих регенерацию ткани. Несколько исследовательских групп обнаружили во взрослых тканях небольшое количество плюрипотентных клеток, экспрессирующих эти белки и способных к трипобластной дифференцировке, но эти результаты пока не получили единодушного признания. Логично предположить, что зачатки органов, обнаруживаемые при их врожденном недоразвитии, могут содержать клетки, остановившиеся на каком-то этапе их нормального онтогенеза, в частности, плюрипотентные клетки, экспрессирующие эмбриональные маркеры. Действительно, проведенное нами исследование биопсийного материала взрослых пациенток с неполной аплазией матки показало, что зачатки эндометрия и миометрия содержат большое количество таких клеток, значительно превосходящее их количество во взрослых тканях. При культивировании в обычных условиях эти клетки вступали в дифференцировку с образованием клеток подобных клеткам эндометрия и миометрия. Ткань зачатков матки содержала также уже полностью дифференцированные клетки эндометрия и миометрия, причем в части биопсий клетки экспрессировали, а в части биопсий не экспрессировали рецепторы эстрогенов и рецепторы прогестерона. Таким образом, в зачатках матки мы наблюдали замедление или остановку дифференцировки клеток. Для лечения подобных состояний разрабатываются методы их ранней диагностики и *in situ* терапии путем местного введения стимулирующих дифференцировку и нормальный гистогенез агентов. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

IN SITU ДЕФОРМАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ В РЭМ

Е.В. Ястремский^{1,2}, Т.Д. Пацаев¹, А.М. Азиева¹,
Д.А. Кириллова¹, А.А. Михуткин¹,
К.Г. Антипова¹, Р.В. Шариков¹, Н.А. Шарикова¹,
К.И. Луканина¹, Т.Е. Григорьев¹,
Р.А. Камышинский², А.Л. Васильев^{1,2}

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова,
ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН, Москва,
Россия

e-mail: e.yastremsky@gmail.com

Ключевые слова: полилактид (PLA), искусственный матрикс, in situ растровая электронная микроскопия, деформация.

Тканевая инженерия — активно развивающееся направление, целью которого в том числе является разработка матриксов — каркасов для роста клеток, с помощью которых возможно выращивать необходимые органы или их части. Одними из наиболее перспективных типов матриксов являются синтетические на основе биосовместимых полимерных материалов.

Такие матриксы могут быть изготовлены с заданными физико-химическими и механическими свойствами [1]. Механические свойства внеклеточного матрикса играют важную роль в развитии и функционировании тканей [2]. Так, матрикс влияет на структуру ткани и оказывает поддерживающую функцию для клеток, которые постоянно взаимодействуют с матриксом с целью сохранения так называемого механического гомеостаза [3], реагируют на механические импульсы (клеточная механотрансдукция) и оказывают силы сжатия на матрикс [4]. Поэтому, для создания матриксов с требуемыми свойствами необходим комплексный анализ формируемых образцов матриксов, в том числе визуализация морфологии самого матрикса и поведения клеточных культур при растяжении и сжатии. [5].

В настоящей работе представлена установка для проведения *in situ* испытаний внутри камеры растрового электронного микроскопа Versa 3D DualBeam, которая позволит проводить измерения механических характеристик матриксов с одновременной визуализацией микроструктурных изменений, и результаты исследований полимерных матриксов различного типа с её помощью.

Работа была проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 21-13-00321 «Деформационное поведение биоразлагаемых матриксов различного типа при механических нагрузках»).

Литература:

1. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Корнюшенков Е.А. и др. Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8. № 1. С. 6–13.
2. Kanda K., Matsuda T., Oka T. *ASAIO journal* (American Society for Artificial Internal Organs: 1992). 1992. V. 38. № 3. P. M382–5.
3. Humphrey J.D., Dufresne E.R., Schwartz M.A. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014. V. 15. № 12. P. 802–812.
4. Dado D., Levenberg S. *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. 2009. V. 20. №. 6. P. 656–664.
5. И.И. Жаркова. Матриксы из биосинтетического сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем для инженерии костной ткани. Дисс. канд. биол. наук. Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2017.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА МОНОНУКЛЕАРЫ КРОВИ

Е.М. Яценко, Д.С. Барановский, Н.С. Семенова

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

e-mail: yatsenko@mrrc.obninsk.ru

Ключевые слова: макрофаги, кондиционная среда, мезенхимальные стволовые клетки, активные формы кислорода.

В настоящее время широко изучается терапевтическое влияние мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на процессы репарации различных органов, при этом остаются нерешенные вопросы, касающиеся межклеточных взаимодействий, окислительно-восстановительный баланс внутри и между МСК и иммунными клетками. Известно, что МСК, а также их кондиционированным средам (КС) характерно ингибирование продукции активных форм кислорода (АФК), которое может играть существенную роль в формировании иммуносупрессивного микроокружения при трансплантации МСК [1]. Целью работы стал анализ влияния концентрации кондиционной среды МСК на иммунные клетки — мишени.

У доноров было получено письменное добровольное согласие на участие в заборе костного мозга. Взвесь клеток МСК $5 \times 10^6 / 10$ мл с сывороткой культивировали при 37°C до достижения 80% конфлюэнтного монослоя. В КС проводили иммуноферментативное измерение концентрации супероксиддисмутазы (SOD3), одного из механизмов МСК противовоспалительного и стимулирующего регенеративные процессы воздействия в поврежденных тканях [2]. В качестве клеток-мишеней использовали моно- и полиморфнонуклеары (МН) фагоцитов, полученные методом градиентного центрифугирования. Для определения продукции АФК в кюветы вносили 1×10^6 выделенных МН в 500 мкл среды Хэнкса, содержащей люминол, к взвеси добавляли КС разной концентрации 0; 12; 25; 50 или 100% соответственно. Величину пика зимозаниндуцированной люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) измеряли в (мВольтах/ 1×10^6 макрофагов) в течение 40 минут на люминометре LKB-Wallac 1251 (Финляндия).

В *in vitro* системе получено, что КС при конечной концентрации в диапазоне от 25 до 100% оказывают значимое ($p \leq 0,05$) дозозависимое угнетающее воздействие на уровень ХЛ-активности МН крови. При этом 50% ингибирование (ИД_{50}) продукции АФК макрофагами наблюдали при 12–25% концентрации КС. Оценка количественного содержания SOD3 в культуральных средах: МН крови, МСК и МН+МСК показала очень низкий уровень ($M \pm m$): $2,6 \pm 0,2$; $1 \pm 0,69$ и $2,5 \pm 0,46$ нг/мл соответственно, т.е. характерное свойство МСК продуцировать SOD3 [2] в наших условиях не проявилось. Полученные нами данные подтверждают необходимость учитывать влияние межклеточных взаимодействий МСК или продуктов их секреции при использовании в терапевтических целях.

Литература:

1. Цыб А.Ф., Петров В.Н., Коноплянников А.Г. и др. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2008. № 3. С. 171–178.
2. Kemp K., Hares K., Mallam E. et al. *J. Neurochem*. 2010. V. 114. № 6. P. 1569–1580.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>T. Lopatina, M. Koni, A. Sarcinella, M.F. Brizzi</i> Tissue regeneration and cancer: inflammation in common	6	<i>Н.А. Александрюшкина, В.С. Попов, П.И. Макаревич</i> Экспериментальные модели оценки заживления кожных ран у грызунов: методология и ограничения трансляционных исследований	11
<i>M. Zoughaib, T.I. Abdullin</i> Synthetic oligopeptide-modified biomaterials	7	<i>А.А. Алексеев, К.А. Филимонов, А.А. Пантелеев, А.А. Бобровников</i> Современные биотехнологические методы в комплексном лечении термических поражений	12
<i>Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева</i> Участие транскрипционных факторов NRF2, NIF, CAR И PXR в регуляции Р-гликопротеина при моделировании окислительного стресса на клетках линии CACO-2	7	<i>Н.А. Алексеева, С.А. Куст, Е.И. Коваленко</i> Адаптивные НК-клетки отличаются высоким пролиферативным потенциалом при длительном культивировании	12
<i>Д.С. Аболин, О.С. Роговая, Е.П. Калабушева, Е.А. Воротеляк</i> Влияние ингибирования YAP — сигналинга на контрактильную способность фибробластов человека в модели эквивалента дермы	8	<i>Л.Л. Алексеенко, А.П. Домнина, И.В. Кожухарова, Ю.С. Иванова, Н.А. Пуговкина, О.Г. Люблинская</i> Динамика изменений молекулярно- генетического профиля мезенхимных стволовых/стромальных клеток эндометрия человека в процессе формирования сфероидов	13
<i>С.М. Авдокушина, Е.О. Стаценко, А.А. Ергешов</i> Характеристика модели остеомиелита на сегментарном дефекте бедренной кости у крыс	8	<i>О.В. Анацкая, А.Л. Рунов, С.В. Пономарцев, М.С. Вонский, А.У. Елмуратов, М.В. Харченко, А.Е. Виноградов</i> Долговременные изменения в транскриптоме сердца крыс после неонатальной непереносимости лактозы	13
<i>С.М. Авдокушина, М.И. Камалов, Т.И. Абдуллин, И.А. Лавров, М. Зухайб</i> Получение биодegradуемых гидрогелей на основе ПЭГ и исследование их совместимости с нейрональными клетками ...	9	<i>К.Г. Антипова, А.Е. Крупнин, Е.А. Храмцова, С.В. Крашенинников, Т.Е. Григорьев</i> Фантомы мягких биологических тканей на основе полиакриламида: получение и свойства	14
<i>М.Ю. Агарёва, Ю.С. Стафеев, С.С. Мичурина, Е.С. Зубкова, И.А. Скляник, Е.А. Шестакова, А.О. Гаврилова, М.С. Синеокая, Е.И. Ратнер, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфенова, М.В. Шестакова</i> Висцеральные мезенхимальные стволовые клетки пациентов с сахарным диабетом 2 типа способствуют накоплению жирных кислот в здоровых адипоцитах	9	<i>И.П. Антропова, Е.А. Волокитина, С.М. Кутепов, К.А. Тимофеев</i> Влияние морфо-функционального статуса тромбоцитов на активность остеогенеза и характеристики перимплантной костной ткани	14
<i>Е.Д. Адамович, Е.Л. Бурьянская, О.В. Градов</i> Мембраномиметические протонообменные структуры в составе комплексных скаффолдов с метастабильными наноканалами	10	<i>М.С. Арбатский, М.А. Виговский, Н.А. Басалова, У.Д. Дьячкова, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Выявление субпопуляций мезенхимных стромальных клеток с различными ответами на профибротические стимулы с помощью анализа транскриптома одиночных клеток	15
<i>С.А. Александрова, Ю.А. Нащекина, А.А. Гайдаш, М.И. Блинова</i> Ответ ммск костного мозга кролика на биокерамический материал до и после покрытия его коллагеном I типа	11	<i>М.С. Арбатский, А.Ю. Ефименко</i> Применение методов машинного обучения и системной биологии в анализе данных транскриптома одиночных клеток	16
<i>Э.И. Александер-Синклер, М.И. Блинова</i> Эквиваленты эпителия роговицы в стратегии терапии роговичной слепоты	11		

- С.А. Артеменко, М.В. Епифанова, А.А. Костин, Е.В. Гамеева, Б.Р. Гвасалия, А.А. Епифанов*
Оценка аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, экстракорпоральной ударно-волновой терапии в коррекции болезни Пейрони 16
- С.А. Артеменко, М.В. Епифанова, А.А. Костин, Г.А. Демяшкин, Е.В. Гамеева, А.А. Епифанов*
Иммунофенотипическая характеристика волокнистого компонента гематотестикулярного барьера при использовании клеточной и ударно-волновой терапии у пациентов с необструктивной азооспермией 17
- С.А. Артеменко, М.В. Епифанова, А.А. Костин, Г.А. Демяшкин, Е.В. Гамеева, А.А. Епифанов*
Оценка эффективности аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, и ударно-волновой терапии при лечении необструктивной азооспермии 18
- С.А. Артеменко, М.В. Епифанова, А.А. Костин, Е.В. Гамеева, Б.Р. Гвасалия, А.А. Епифанов*
Аутоплазма, обогащенная тромбоцитарными факторами роста, и экстракорпоральная ударно-волновая терапия в коррекции эректильной дисфункции 18
- С.А. Артеменко, М.В. Епифанова, А.А. Костин, Е.В. Гамеева, А.А. Епифанов*
Терапия мужского бесплодия с помощью аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, и ударно-волновой терапии ... 19
- Ш.Д. Ахмедов, С.А. Афанасьев, И.В. Степанов, М.Е. Трусова, С.И. Твердохлебов, Б.Н. Козлов*
Новое поколение биodeградируемого покрытия для коронарных стентов, состоящее из химически модифицированных нанокomпозитов, изменяющих структуру атеросклеротических бляшек человека *ex vivo* с целью предотвращения рестенозирования коронарных артерий 19
- Э.Р. Ахметзянова, А.В. Тимофеева, М.Н. Журавлева, Я.О. Мухамедшина*
Исследование поляризации клеток микроглии на модели травмы спинного мозга различной степени тяжести *in vitro* 20
- А.И. Ахметова, Т.О. Советников, М.А. Тихомирова, И.В. Яминский*
Сканирующая капиллярная микроскопия опухолевых клеток под воздействием цитотоксических средств 20
- С.А. Базанович, М.А. Звягинцева, Я.В. Морозова, С.М. Радаев, В.А. Смирнов, А.А. Гринь, С.И. Рябов*
Оценка эффективности терапии криоконсервированными мононуклеарными клетками пуповинной крови человека травмы спинного мозга у крыс в остром периоде 21
- С.А. Базанович, М.А. Звягинцева, Я.В. Морозова, С.М. Радаев, В.А. Смирнов, А.А. Гринь, С.И. Рябов*
Терапия криоконсервированными мононуклеарными клетками пуповинной крови человека травмы спинного мозга в остром периоде: эксперимент и клиника 21
- К.Ю. Базылева, К.Г. Антипова, С.В. Крашенинников, С.Н. Малахов, Р.В. Шариков, Т.Е. Григорьев*
Структура и свойства пористых материалов, полученных методом лиофилизации 22
- В.П. Баклаушев, О.В. Дуров, В.А. Кальсин*
Тканевая инженерия при спинальной травме — сегодня и завтра 22
- О.В. Баранов, А.Ю. Федотов, В.С. Комлев*
Композиционные материалы на основе низкотемпературных фосфатов кальция допированных катионами железа 23
- Д.С. Барановский, Я. Демнер, С. Нюрнбергер, А.В. Ляндуп, Х. Редл, М. Хиллберт, М.Е. Крашенинников, О.А. Красильникова, И.Д. Клабуков, И. Мартин, А. Барберо*
Реконструкция трахеи в эксперименте с использованием тканеинженерной конструкции на основе микроперфорированного хряща трахеи человека и назальных хондроцитов 24
- Н.А. Басалова, М.А. Виговский, М.С. Арбатский, О.А. Григорьева, А.Е. Толстолужинская, У.Д. Дьячкова, В.С. Попов, М.Н. Карагаур, Н.И. Калинина, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко*
МикроРНК-29с и 129 в составе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток способствуют разрешению фиброза лёгких через управление дифференцировкой миофибробластов и их предшественников 24
- Л.С. Басович, А.Б. Малашичева*
Регулирование экспрессии генов методом рнк-интерференции лентивирусными векторами, кодирующими короткие шпилечные рнк 25
- А.Н. Бастрич, Д.А. Петрова, Б.Я. Алексеев, А.А. Рослякова, Д.Г. Бельцевич, П.А. Никифорович, Н.С. Кузнецов, Е.В. Бондаренко, С.А. Сергиенко, Г.Д. Ефремов, Л.С. Урсова*
Живая трехмерная модель адренкортикального рака для персонализированной медицины и тестирования новых препаратов и методов терапии 25
- Е.И. Бахмет, М.Н. Гордеев, А.С. Зиновьева, Е.Е. Петренко, А.Н. Томилин*
Роль транскрипционных факторов в динамике плюрипотентности 26
- И.Б. Белоглазова, Е.С. Зубкова, К.В. Дергилев, Ю.Д. Василец, Е.В. Парфенова*
Новый взгляд на 2D модели ангиогенеза *in vitro* .. 26

<i>М.Б. Белякова, Н.В. Костюк, М.В. Черноруцкий, Д.В. Лещенко, М.В. Миняев</i> Синтез и оформление коллагенового волокна в культуре клеток жировой ткани крыс	27	<i>М.С. Божокин, С.А. Божкова, Ю.В. Сопова, М.Г. Хотин</i> Сравнение способов модификации культуры МСК для клеточной инженерии гиалинового хряща	32
<i>А.Е. Бигильдеев, Д.М. Карпенко, А.В. Садовская, А.И. Дорофеева</i> Экспрессия фактора некроза опухолей альфа конститутивно увеличивается в костях сублетально облученных мышей	27	<i>В.С. Бойченко, П.С. Климович, А.А. Щипова, К.А. Рубина, Е.В. Семина</i> Механизмы участия урокиназного рецептора в репрограммировании клеток опухолевой стромы	33
<i>С.О. Бикеева, О.Н. Чернова, Д.Э. Сабирова, Е.В. Федоренко, Т.В. Балтина</i> Влияние локальной гипотермии на сохранение нервной ткани у крыс после травмы спинного мозга	28	<i>В.В. Болтовская, В.А. Болтовский, А.В. Болтовский</i> Устройство для моделирования термического ожога	33
<i>П.Ю. Бикмулина, Н.В. Кошелева, А.И. Шпичка, П.С. Тимашев</i> 3D биопечать функциональных трехмерных конструкторов на основе сфероидов из мезенхимных стромальных клеток	29	<i>Е.Н. Большасов, В.М. Бузник, Г.Ц. Дамбаев, Д.Е. Кульбакин, Е.Ю. Варакута</i> Фторполимерные материалы и изделия для реконструктивно-восстановительной хирургии ..	34
<i>Н.Б. Бильдюг</i> Связанные с интегринами киназы в регуляции гладкомышечного актина и процесса заживления раны на кожных фибробластах	29	<i>А.Д. Бондарев, П.А. Тюрин-Кузьмин</i> Инсулин-зависимая сигнализация в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках жировой ткани	34
<i>А.И. Билялов, Д.Д. Филимошина, Н.С. Филатов, А.А. Билялова, А.А. Титова, Л.Р. Гатауллинина, А.С. Плюшкина, Е.И. Шагимарданова, Р.В. Деев, А.П. Киясов, О.С. Козлова, А.А. Несмелов, О.А. Гусев</i> Оценка репаративного хондрогенеза эластического хряща иглистых мышей	30	<i>Н.А. Бондаренко, М.А. Суровцева, И.И. Ким, А.П. Лыков, И.А. Исаков, А.Н. Трунов, В.В. Черных, О.В. Повещенко</i> Изменения функциональной активности мезенхимальных стволовых клеток лимба под влиянием кондиционной среды эпителиальных клеток лимба роговицы	35
<i>А.А. Билялова, Н.С. Филатов, Д.Д. Филимошина, А.И. Билялов, А.А. Титова, Л.Р. Гатаулина, Е.И. Шагимарданова, А.П. Киясов, О.С. Козлова, А.А. Несмелов, О.А. Гусев</i> Особенности строения надпочечников иглистых мышей	30	<i>Н.А. Бондаренко, Н.А. Кихтенко, О.В. Повещенко, М.А. Суровцева, И.И. Ким, П.Г. Мадонов</i> Исследование цитотоксического действия пегилированного рекомбинантного человеческого интерферона-лямбда-1 на клетки эпителия конъюнктивы	35
<i>М.И. Блинова, Н.А. Михайлова</i> Пионерские работы Г.П. Пинаева по созданию коллекции клеточных культур и клеточных продуктов для восстановления поврежденных тканей человека	31	<i>Н.А. Бояринова</i> Применение стволовых клеток при повреждении голосового отдела гортани	36
<i>П.И. Бобылёва, Ю.В. Рудимова</i> Экспрессия генов, ответственных за эпигенетическую регуляцию, в МСК in vitro при пониженном содержании кислорода	31	<i>Н.В. Боярская, О.С. Качанова, А.А. Лобов, А.А. Шишкова, Б.Р. Зайнуллина, А.А. Пичугин, А.А. Филиппов, В.Е. Успенский, А.Б. Малашичева</i> Перспективный ингибитор кальцификации сердечно-сосудистой системы — кренигацестат (LY3039478)	36
<i>М.Е. Богомякова, Е.К. Секретова, К.С. Ануфриева, П.О. Хабарова, А.Н. Казакова, П.А. Бобровский, Т.В. Григорьева, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i> Чувствительность производных ипск к аутологичным НК-клеткам обусловлена дисбалансом экспрессии лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам НК-клеток	32	<i>В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, А.А. Расторгуева, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Никитина, В.А. Брумберг, Д.Ю. Усупжанова, Е.Е. Ломоносова, Н.В. Соколова, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, А.С. Самойлов</i> Эффективность применения лиофилизата кондиционированной среды и амниотической мембраны при местных лучевых поражениях	37

<i>А.А. Будаев, Н.В. Боровкова, А.Ю. Николаев, М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Т.В. Черненькая</i> Влияние стерилизации в среде сверхкритического диоксида углерода на качество консервированных аллогенных сухожилий	38	<i>И.В. Вахрушев, Г.Е. Леонов, А.В. Цветкова, В.Д. Новикова, Л.А. Кирсанова, П.А. Каралкин, С.А. Родионов, Н.С. Сергеева, Ю.Б. Басок, К.Н. Ярыгин</i> Сфероиды на основе мезенхимальных стромальных клеток как модельный объект тканевой инженерии	43
<i>А.А. Будюкова, С.В. Курбангалеева, М.О. Гомзикова</i> Иммunosupрессивная активность индуцированных микровезикул	38	<i>Т.Ф. Вепхадзе, М.А. Виговский, Н.С. Курочкина, П.А. Махновский, О.А. Григорьева, Е.М. Леднев, В.В. Филиппов, Я.Р. Бородай, М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов</i> Влияние старения на фоне хронического воспаления и снижения двигательной активности на транскриптом скелетной мышцы человека	44
<i>И.Н. Булыгина, Ф.С. Сенатов, П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Попонова, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, А.В. Рязанова, Р. Чоудхари, А.В. Громов, А.С. Карягина</i> Диопсид как носитель рекомбинантного ВМР-2 для разработки новых материалов для регенерации костной ткани	39	<i>М.А. Виговский, Н.А. Басалова, У.Д. Дьячкова, В.С. Попов, А.Е. Толстолужинская, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Сенесцентные мезенхимные стромальные клетки теряют способность подавлять развитие фиброза легких при старении	44
<i>О.Ю. Буренина, Ю.П. Рубцов, М.С. Павлюков, О.Е. Мусатова, Т.С. Зацепин, М.П. Рубцова, О.А. Донцова</i> Новые некодирующие РНК, ассоциированные с глиобластомой	39	<i>М.А. Водякова, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов</i> RTCA-профилирование мезенхимальных стромальных клеток в рамках экспертизы качества	45
<i>Е.Л. Бурьянская, О.В. Градов, М.А. Градова, Д.А. Киселев, В.В. Кочервинский</i> Биомедицинские приложения сегнетоэлектрических полимеров на основе винилиденфторида в регенеративной медицине .	40	<i>Е.С. Войнова, П.А. Тюрин-Кузьмин, К.Ю. Кулебякин, О.А. Григорьева, Е.С. Новоселецкая, Н.А. Басалова, Н.А. Александровская, М.С. Арбатский, М.А. Виговский, А.А. Зиновьева, Е. Бахчинян, А.Ю. Ефименко</i> Нарушения гомеостаза жировой ткани при старении связаны с развитием инсулинорезистентности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток	45
<i>Н.В. Бычков, А.А. Захаревич, Т.Е. Григорьев</i> Повышение гидрофильности полимерных материалов на основе полилактида	40	<i>Д.А. Волков, И.Е. Ребров, Т.Е. Григорьев</i> Перспективный электропроводящий материал на основе композита хитозан-серебро с добавлением полиэтиленоксида	46
<i>И.Ю. Бычкова, Х.А. Абдусидов, В.В. Рогинский</i> Эмбриональное развитие некоторых сосудов головы и шеи	41	<i>М.В. Волкова, В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, С.П. Рыбалкин, Е.В. Ковалева, Г.И. Фильков, М.О. Дурыманов</i> Экспериментальное исследование влияния мезенхимальных стромальных клеток на заживление химического ожога	46
<i>Я.М. Валиева, А.В. Игрункова, А.Л. Файзуллин, Н.М. Файзуллина, А.В. Курков</i> Морфологическое исследование значимости клеточного старения для органотипической регенерации хряща	41	<i>Е.А. Воловиков, Д.М. Спиринов, А.Н. Богомазова</i> Получение и характеристика ИПСК из клеток человека с мутацией в гене GNAO1 для моделирования наследственной эпилепсии	47
<i>М. Ваньямбе, И.П. Иванова, Д.В. Дёмина, М.Н. Давыдова, Г.В. Селедцова, Е.А. Блинова</i> Т-клеточная иммунотерапия при рассеянном склерозе	42	<i>Н.С. Волошин, К.Ю. Кулебякин</i> Регуляция адипогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток глюкогоноподобным пептидом-1	47
<i>А.В. Васильев, В.С. Кузнецова, Т.Б. Бухарова, Т.Е. Григорьев, Ю.Д. Загоскин, И.И. Бабиченко, С.Н. Чвалун, Д.В. Гольдштейн, Ф.Ф. Лосев, А.А. Кулаков</i> Композиция на основе реакетилированного хитозан-глицерофосфатного гидрогеля с высокопористыми PLA-гранулами и ВМР- 2 для регенерации костной ткани	42	<i>Е.А. Воротеяк, Е.И. Моргунов, Э.С. Черных, О.С. Роговая, Е.П. Калабушева</i> Регенерация кожи: очевидные модели и неочевидные результаты	48

<i>А.Н. Габашвили, Д.Д. Наместникова, И.Л. Губский, К.К. Сухинич, Н.А. Александрюшкина, Н.С. Чмелюк, С.С. Водопьянов, А.С. Семкина, М.В. Ефремова, П.И. Макаревич, М.А. Абакумов</i> Генетически кодируемая метка для неинвазивного мониторинга мезенхимальных стволовых клеток 48	<i>В.С. Глазьева, П.И. Макаревич, Н.А. Александрюшкина</i> Разработка алгоритма получения персонифицированных тканеинженерных конструкций в виде пластов из мезенхимных стволовых клеток 53
<i>М.А. Габриелян, П.А. Ахметова, В.Д. Муренце</i> Цитопротективный эффект секрета МСК жировой ткани 49	<i>В.В. Глебов, В.В. Шевцов, Е.В. Аникина</i> Физиологические механизмы регенерации клеток организма и возрастные заболевания человека 54
<i>А.О. Гайдамака, Л.Ш. Измайлова, Е.А. Воротеляк</i> Характеристика предполагаемой прогениторной популяции стромы эндометрия мышцы на разных стадиях онтогенеза 49	<i>Е.Г. Глинская, О.Н. Кошуба, А.Н. Копылов, С.Ш. Каршиева, А.А. Левин, С.В. Петров, А.В. Ковалёв, В.А. Миронов, Е.В. Кудан</i> Биопечать трехмерных конструктов на основе коллагена и сфероидов из хондроцитов человека для регенерации хрящевой ткани 54
<i>Р.Р. Гарифулин, М.А. Давлеева, Э.И. Бариев, С.С. Таргачев, Р.Х. Ахметов, И.С. Минязева, В.П. Петрова, А.Р. Хамитов, А.А. Измайлов, Р.Р. Исламов</i> Ремоделирование нейроглии в поясничном утолщении спинного мозга после контузионной травмы в нижнегрудном отделе у мини-свиней 50	<i>А.А. Глухов, А.А. Андреев, П.А. Коновалов, С.С. Захарова, Н.О. Михайлов</i> Аппликационное и гидропрессивное применение водородной воды в лечении ран мягких тканей (экспериментальное исследование) 55
<i>А.Д. Гелетканич, Е.Б. Жигмитова, Е.Е. Безсонов</i> Антиоксидантное действие витамина Е и экстракта амлы на цибриды 50	<i>А.С. Гнеденков, С.Л. Синебрюхов, В.С. Филонина, С.В. Гнеденков</i> Особенности коррозии биорезорбируемых магниевых сплавов: <i>in vitro</i> исследования, формирование защитных покрытий 56
<i>М.Ю. Герасимов, Д.С. Островский, Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенков</i> Биотрансплантат культивированных клеток эпителия губы для реконструкции эпителия роговицы 51	<i>И.А. Говорова, С.Ю. Никиточкина, О.И. Суягина, О.Л. Черкашина, Е.А. Воротеляк, А.Л. Риппа</i> Исследование роли Yap1 в разных типах органоидов постнатальных легких мышей 56
<i>Т.Е. Гетманова, Ю.Р. Джумалиева, В.Р. Тагланов</i> Получение секрета стволовых клеток производных нервного гребня, культивированных в безсывороточной среде 51	<i>Д.В. Голиусова, И.В. Копылова, М.В. Терякова, О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова</i> Получение и характеристика кардиомиоцитов с мутацией в гене филамина с (<i>FLNC</i>) из ИПСК пациента с рестриктивной кардиомиопатией 57
<i>З.Е. Гилязиева, А.С. Пономарев, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов</i> Изучение изменений в опухолевых сфероидах аденокарциномы молочной железы человека при добавлении индуцированных цитохалазином в мембранных везикул 51	<i>К.П. Головкин, В.Н. Александров, И.А. Барсук</i> Перспективы использования трехмерной биопечати в комплексном лечении глубоких ожогов 57
<i>И.В. Гилевич, Е.А. Коломийцева, Э.Н. Шубров, С.Н. Лепетунов, Г.А. Забунян, Р.В. Чучварев</i> Применение производных плазмы, обогащенной тромбоцитами, у пациентов хирургического профиля 52	<i>Е.С. Головнева, Р.В. Тахавиев, Г.В. Брюхин</i> Особенности миосателлитоцитов различных групп мышц при тренировках, лазерной терапии и приеме аминокислот 58
<i>И.В. Гилевич, Е.А. Коломийцева, В.Р. Потапова</i> Выбор оптимальных условий сохранения суспензии клеток, предназначенной для использования 52	<i>Ю.Д. Гольцева, К.В. Дергилев, А.А. Гусева, М.А. Болдырева, Е.В. Парфенова, И.Б. Белоглазова</i> Моделирование периваскулярной ниши сердца путем обогащения кардиосфер эндотелиальными клетками 58
<i>И.В. Гилевич, И.С. Поляков, А.Л. Коваленко, Д.Д. Карал-оглы, С.В. Орлов, В.А. Порханов</i> Приматы как лабораторное животное для создания модели повреждений дыхательных путей 53	<i>А.Н. Горностаева, А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова</i> Особенности паракринного профиля мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях провоспалительного микроокружения 59

- А.Ю. Городков, Т.Х. Тенчурин, С.В. Крашенинников, Ш.Т. Жоржолиани, Ю.М. Цыганков, А.Д. Шепелев, В.Г. Мамагулашвили, С.Н. Чвалун*
Использование новых полимеров для преодоления проблемы биомеханического несоответствия синтетического сосудистого протеза и артериального сосуда 59
- В.А. Горшков-Кантакузен*
Сфероид как новый объект патентного права 60
- О.В. Градов*
Векторные методы визуализации и прогнозирования динамики нейроморфогенеза и верификации его вычислительных моделей: колокализация модельных векторных полей гальванотаксиса и измеренных мгновенных полей скоростей аксональных потоков 60
- Д.А. Грехнёв, А.А. Ошколова, А.В. Крисанова, А.А. Кручинина, Ю.В. Новикова, Л.Д. Беликова, С.А. Ключников, О.С. Лебедева, Е.В. Казначеева В.А. Вигонт*
Пациент-специфичные модели болезни Паркинсона для исследования кальциевой сигнализации 61
- А.В. Гречина, И.О. Козлов, А.А. Венедиктов, Г.А. Пьявченко, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, А.О. Никольская, Е.А. Волкова, Н.П. Можейко, А.В. Люндуп, Л.И. Давыдова, А.Ю. Архипова, В.Г. Богуш, С.В. Готье*
Применение методов машинного обучения и AI-анализ для визуализации и верификации регенерации гистоструктуры печени 62
- И.А. Гривенников, Д.М. Шимченко, Е.В. Новосадова, С.А. Антонов, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов, В.З. Тарантул*
Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека и их производные в качестве модели для поиска и тестирования соединений с нейропротекторной активностью 62
- А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, В.А. Сургученко, Н.П. Шмерко, В.К. Кулакова, Р.В. Иванов, В.И. Лозинский, А.М. Суббот, В.И. Севастьянов*
Исследование биологических свойств криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина для биомедицинских технологий 63
- Т.Е. Григорьев, Ю.Д. Загоскин, К.И. Луканина, Т.К. Токаев, М.В. Сеницын, Е.А. Храмцова, В.И. Севастьянов, С.Н. Чвалун*
Пористые матриксы с биомиметической структурой и свойствами 63
- О.А. Григорьева, Н.А. Басалова, М.А. Виговский, У.Д. Дьячкова, А.Ю. Ефименко*
Механизмы подавления дифференцировки миофибробластов с помощью индукции адипогенеза: управление развитием фиброза ... 64
- Т.М. Гринчук, М.А. Шорохова, Н.Н. Никольский*
Регенеративный и генетический потенциал эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека *in vitro* 64
- О.В. Груздева, Ю.А. Дылева, Е.В. Белик, А.В. Понасенко, А.О. Поддубняк, А.Г. Кутихин, В.Е. Маркова, С.В. Иванов, О.Л. Барбараш*
Особенности экспрессии ферментов основного пути синтеза церамидов *de novo* в жировой ткани сердца и сосудов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями 65
- А.А. Гусева, К.В. Дергилев, Е.С. Зубкова, А.В. Андреев, М.Ю. Меньшиков, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Ю.Д. Гольцева, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова*
Прекондиционирование клеток кардиосфер с помощью липополисахаридов вызывает усиление секреции проангиогенных факторов ... 65
- К. Даиоб, М. Зухайб, Т.И. Абдуллин, Д. Салахиева, Р.И. Гарифуллин*
In vitro исследование биоактивных фибриллярных матриксов на основе пептидных амфифилов 66
- Д.М. Дарвиш, И.О. Гаврилюк, А.Н. Куликов, В.В. Васильева, Е.С. Цобкалло, Н.А. Михайлова*
Разработка офтальмологических тампонирующих средств на основе коллагеновых и альгинатных гелей 66
- Э.Т. Дегирменджи, С.С. Хилько*
Анализ современных публикаций о новых методах генной терапии для лечения последствий инфаркта миокарда 67
- А.В. Дегтярева, В.В. Зубков, М.Х. Исаева, Е.А. Филиппова, М.Б. Албегова, А.А. Буров, И.В. Дубровина, К.В. Горюнов, Ю.А. Шевцова, Д.Н. Силачев, Г.Т. Сухих*
Перинатальные МСК в комплексном лечении детей с заболеваниями печени 67
- Е.В. Дементьева, С.В. Павлова, А.Е. Шульгина, К.А. Проняева, С.М. Закиян*
Использование геномных и клеточных технологий для выяснения клинического значения мутаций в генах, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией 68
- А.Г. Демченко, Е.В. Кондратьева, В.Ю. Табаков, Е.Л. Амелина, А.В. Лавров, С.А. Смирнихина*
Бронхиальные и легочные органоиды из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток как модель для персонализированной диагностики и терапии муковисцидоза 68
- С.В. Демьяненко, В.В. Гузенко, С.А. Батальщикова*
Участие деацетилаз гистонов в регуляции активности белка Р53 в острый и ранний восстановительный периоды после инсульта 69

<i>К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, А.А. Гусева, Е.В. Парфенова</i> Сравнительный анализ способов сборки кардиальных мезотелиальных сфероидов	69	<i>Н.Н. Диденко, А.А. Долгалев, Д.В. Бобрышев, С.Р. Адешелидзе</i> Цитоспецифическая биосовместимость новых материалов-матрикс для имплантологии с МСК человека	74
<i>К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, А.А. Гусева, И.Б. Белоглазова, А.В. Андреев, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова</i> Сфероиды на основе эпителиоподобных клеток мезотелия человека (эпироиды) — модель для изучения мезанизмов развития эпи-/субэпикардального фиброза	70	<i>О.В. Дилекова, В.В. Митенко</i> Экспрессия онкомаркёрного белка В23 в опухолевых клетках молочной железы у плотоядных	74
<i>К.В. Дергилев, А.А. Гусева, Е.С. Зубкова, А.В. Андреев, М.Ю. Меньшиков, З.И. Цоколаева, И.Б. Белоглазова, Ю.Д. Гольцева, Р.С. Акчурин, Е.В. Парфенова</i> Преколонизирование клеток кардиосфер с помощью трансформирующего фактора роста бета 1 вызывает противовоспалительные изменения их секретома	70	<i>С.В. Диндяев, Д.В. Касаткин, Ф.А. Ромашин, Т.С. Пупышева</i> Участие гистамина и серотонина в процессах регенерации тканей матки крыс	75
<i>К.В. Дергилев, И.Б. Белоглазова, З.И. Цоколаева, Ю.Д. Гольцева, Е.В. Парфенова</i> Дефицит рецептора активатора плазминогена урокиназного типа ведет к нарушению ангиогенных свойств васкулогенных клеток-предшественниц, развитию васкулопатии и фиброза в сердце мыши	71	<i>П.М. Докшин, А.Б. Малашичева</i> Взаимодействие между сигнальными путями Notch и BMP в эндотелиально-мезенхимном переходе	75
<i>К.В. Дергилев, Е.В. Парфенова</i> Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа на перепутье между репарацией и патологией сердца	71	<i>А.А. Долгалев, Д.В. Бобрышев, Д.З. Чониашвили, Н.Н. Диденко, М.Г. Амбарцумов, Ю.А. Сергеев</i> Состав поверхности и биосовместимость имплантационных материалов, изготовленных с помощью аддитивных технологий	76
<i>Л.В. Дергунова, И.Б. Филиппенков, Н.Ф. Мясоедов, С.А. Лимборская</i> Ответ транскриптома клеток мозга на воздействие синтетических пептидов меланокортинового ряда в норме и в условиях экспериментальной ишемии	72	<i>А.П. Домнина, И.К. Кунеев, Ю.С. Иванова, О.Л. Люблинская</i> Разработка трехмерной модели эндометрия человека in vitro	76
<i>П.И. Дерябин, А.В. Бородкина</i> Старение стромальных клеток нарушает тканеспецифическую трансформацию эндометрия и взаимодействие с клетками трофобласта	72	<i>А.Б. Доржиева, Г.В. Селедцова</i> Иммуногенные свойства противоопухолевой тестикулярной вакцины	77
<i>С.С. Джауари, Н.А. Басалова, М.Н. Скрябина, Н.А. Александрович, В.Ю. Балабаньян, В.С. Попов, А.Ю. Ефименко, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков, В.А. Ткачук, М.Н. Карагаур</i> Разработка препарата для лечения геморрагического инсульта на базе секретомы мезенхимных стволовых клеток (МСК)	73	<i>А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова</i> Различия В экспрессии генов в мезенхимных клетках-предшественницах из костного мозга больных апластической анемией в дебюте при разных формах заболевания	78
<i>В.А. Дзряян, М.А. Питинова</i> Анализ экспрессии и внутриклеточной локализации фактора транскрипции E2F1 в периферической нервной системе крыс после аксотомии	73	<i>Н.И. Дризе, И.Н. Шипунова, Н.В. Сац, А.И. Дорофеева, Н.М. Капранов, А.В. Садовская, Ю.В. Ткачук, А.В. Бондаренко, М.А. Котский, И.Б. Капланская, Т.В. Васильева, Н.А. Петинати</i> Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из костного мозга мини пиггов, имплантированные под капсулу почки, образуют очаг, содержащий кость, стромальные клетки костного мозга и мышцы	78
		<i>М.Г. Дроздова, В.Н. Бирюкова, Н.А. Сажнев, Н.Р. Кильдеева, Е.А. Марквичева</i> Матрикс из фиброина, сшитого дженипином, для тканевой инженерии: получение, изучение и оценка in vitro	79

<i>Е.С. Дроздова, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, С.П. Медведев, Д.А. Сорोगина, А.Е. Копытова, Г.В. Байдакова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, С.М. Закаева</i> Клеточная модель для изучения молекулярно-генетических механизмов болезни паркинсона, ассоциированной с мутацией в гене <i>GVA</i>	79	<i>А.А. Ергешов, Т.И. Абдуллин, М. Зухайб</i> Эффекты некоторых переходных металлов в составе гидрогелей при подкожной имплантации	85
<i>А.Д. Дубко, А.В. Свирская, М.Ю. Юркевич, Д.Б. Нижегородова, М.М. Зафранская</i> Получение многокомпонентных биоискусственных конструкций печени крысы ...	80	<i>П.С. Еремин, Е.Ю. Костромин, П.А. Марков, И.Р. Гильмутдинова, Т.В. Кончугова</i> Изучение воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на пролиферативную активность клеток стромально-васкулярной фракции	85
<i>А.Б. Дымников, Е.А. Гостева</i> Новые подходы к формированию наноструктурированной поверхности титановых имплантатов	80	<i>П.С. Ермакова, А.Ю. Богомолова, Наралиев Н.У., Д.М. Кучин, Е.А. Васильчикова, М.А. Батенькин, С.А. Чесноков, В.Е. Загайнов, Е.В. Загайнова, А.В. Кашина</i> Создание микроинкапсулирующей технологии для защиты эндокринных клеток поджелудочной железы при трансплантации	86
<i>К.С. Дырина, Р.А. Абрамович, Р.Д. Вырщиков, О.Г. Потанина, Ю.А. Фомина, Н.Б. Шестопалова, Т.Ю. Калюта, А.С. Федонников</i> Перспективы создания лекарственных средств на основе аврана лекарственного в регенеративной медицине	81	<i>Е.Д. Жекибаев, О.И. Желтова, И.В. Меледина, Е.Я. Шевеля, Е.Р. Черных</i> Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани в терапии пациентов с циррозом печени различной этиологии	86
<i>У.Д. Дьячкова, М.А. Вигровский, Н.А. Басалова, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Внеклеточные везикулы МСК переключают фенотип макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный	82	<i>И.В. Живодерников, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова</i> Влияние моделирования микрогравитации на матрисом мезенхимальных стромальных клеток <i>in vitro</i>	87
<i>П.Е. Евстигнеева, В.Е. Успенский, И.В. Воронкина</i> Биохимический анализ компонентов внеклеточного матрикса аорты и эндотелиального гликокаликса при различных патологиях	82	<i>О.А. Жукова, М.В. Бычинин, И.М. Калугин, С.М. Юсубалиева, Г.М. Юсубалиева</i> Динамическая роль FOXP3 ⁺ Treg в развитии сепсиса при SARS-CoV-2 и терапевтические возможности CAR-Treg в профилактике осложнений	87
<i>З.А. Евсюкова</i> Консервативное восстановление мягких тканей лица после укусов животных	83	<i>Н.А. Забокрицкий</i> Разработка нового препарата — гепатопротектора и оценка его цитопротекторных и регенеративных свойств ...	88
<i>М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, И.И. Кобякова, М.Л. Бугрова, Д.Д. Линькова</i> Скаффолд как искусственная ниша для мезенхимальных стволовых клеток	83	<i>Ю.Д. Загоскин, Н.М. Кузнецов, А.С. Семкина, А.А. Захаревич, С.Н. Чвалун, Т.Е. Григорьев</i> Композиционные гидрогели на основе хитозана и пористых полилактидных микрочастиц	88
<i>М.И. Ездакова, Д.К. Матвеева, С.В. Буравков, Е.Р. Андреева</i> Роль щелевых контактов в поляризации фенотипа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	84	<i>Ю.Д. Загоскин, А.А. Захаревич, Ю.С. Фомина, С.Н. Чвалун, М.М. Алексанян, С.А. Макаров, Т.Е. Григорьев</i> Высокопористые материалы на основе сополимеров полилактида и поликапролактона с эффектом памяти формы	89
<i>Н.И. Енукашвили, И.Е. Коткас, В.В. Багаева, Д.С. Боголюбов, А.Ю. Бородина, Д.С. Никитенко, Г.С. Яцемирский, А.Ю. Артамонов, И.В. Миндукшев, О.В. Супильникова, И.И. Масленникова, Е.М. Приходько</i> Использование непокрытых частиц оксида железа Fe ₃ O ₄ для мечения клеток и последующего их отслеживания <i>in vivo</i> методом магнитно-резонансной томографии	84	<i>А.А. Захаревич, Т.Е. Григорьев</i> Новые возможности создания материалов для регенеративной медицины на основе органорастворимого хитозана	89

<i>И.С. Захарова, А.И. Шевченко, Н.А. Тмоян, Е.А. Елисафенко, Е.С. Зубкова, А.А. Слепцов, М.С. Назаренко, Н.В. Желтышева, М.В. Ежов, В.В. Кухарчук, Е.В. Парфёнова, С.М. Закиян</i>	<i>А.М. Иванова, Р.А. Чанышев, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин</i>
Клеточные технологии в исследовании молекулярно-генетических основ семейной гиперхолестеринемии 90	Изоформный состав мРНК α1A- адренорецепторов, индуцируемых при действии норадреналина на мск 95
<i>А.Е. Згодова, С.И. Павлова, А.А. Некрасова, Д.П. Бояркин, А.М. Сурин, Э.В. Бакаева</i>	<i>Е.В. Ивановская, В.А. Дятлов</i>
Изоликиривитигенин препятствует гибели первичной нейроглиальной культуры в условиях глутаматной эксайтотоксичности 90	Модельные нанокорпускулярные носители для внутриядерной доставки физиологически активных веществ 95
<i>А.И. Зельцер, Р.А. Сурменев, М.А. Сурменева, К.В. Шайтан, А.П. Бонарцев, И.И. Жаркова</i>	<i>Г.А. Ивахова, Н.Б. Бильдюг</i>
Влияние магнитных наночастиц с оксидом графена на рост мезенхимальных стволовых клеток крысы 91	Влияние внеклеточного матрикса на кардиогенную дифференцировку клеток 96
<i>Н.И. Зернов, Е.А. Попугаева</i>	<i>Д.А. Иволгин, Ю.А. Домбровская, Н.И. Енукашвили, Р.Е. Банашков, Н.Ю. Семенова, И.А. Карабак, А.В. Котова, А.В. Силин</i>
Модулятор TRPC6 проявляет нейропротекторные свойства, восстанавливает контекстную, условную, но не пространственную память 91	Создание фибриновых скаффолдов, заселённых стволовыми клетками пульпы и периодонта и перспективы их использования в эксперименте 96
<i>А.И. Зими́на, А.А. Никитин, В.А. Львов, С.С. Водопьянов, Ф.С. Сенатов</i>	<i>Т.В. Ильчибаева, А.С. Цыбко, Р.С. Ярков, Д.В. Ерёмин, М.В. Ведунова, В.С. Науменко</i>
Полимерный композиционный материал с эффектом памяти формы на основе полилактида и наночастиц феррита кобальта для адаптивных медицинских изделий 92	Индукция сверхэкспрессии C/EBPβ при помощи аденоассоциированного вирусного конструктора приводит к изменениям нейрональной пластичности в гиппокампе крыс 97
<i>А.А. Зиновьева, Е.Бахчинян, Е.С. Войнова, К.Ю. Кулебякин, В.Ю. Сысоева, П.А. Тюрин-Кузьмин, А.Ю. Ефименко, В.И. Чечехин, Н.С. Волошин</i>	<i>А.К. Илющенко, К.Т. Калинин, Н.Г. Седуш, А.Е. Крупнин, С.Н. Чвалун</i>
Мск жировой ткани пожилых доноров демонстрируют гетерогенность в дифференцировочном, пролиферативном потенциалах и инсулиновой сигнализации 92	Биоразлагаемые олигомеры на основе лактонов для биопечати 97
<i>В.О. Золотухин, А.А. Андреев, А.А. Глухов, В.В. Шишкина</i>	<i>А.Г. Ионова, С.М. Космачева, К.А. Криворот, А.Н. Мазуренко, А.В. Малашенко, М.П. Потапнев, В.И. Асаевич</i>
Использование пантов марала в комбинации с амикацином для купирования хронического остеомиелита 93	Создание биотрансплантата для спондилита на основе мезенхимальных стромальных клеток и плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, человека 98
<i>Д.Б. Зоров, Л.Д. Зорова, С.И. Ковальчук, В.А. Попков, В.П. Черников, А.А. Жарикова, А.А. Хуторненко, С.Д. Зоров, К.С. Плохих, Р.А. Зиновкин, Е.А. Евтушенко, В.А. Бабенко, И.Б. Певзнер, Ю.А. Шевцова, К.В. Горюнов, Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих, Д.Н. Силачев</i>	<i>Н.С. Кавушевская, Л.Г. Тер-Аветикян, Т.А. Синюкова, Л.В. Коваленко</i>
Поиск функциональных митохондрий в экстраклеточных везикулах, производных мезенхимальных стромальных стволовых клеток 94	Влияние полифенольных экстрактов плодов рода <i>Vaccinium</i> на оксидативный статус крови у крыс 98
<i>Е.С. Зубкова, А.П. Калинин, И.Б. Белоглазова, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова</i>	<i>Е.П. Калабушева, О.Л. Черкашина, Д.С. Аболин, О.С. Роговая, Е.А. Воротеяк</i>
Влияние интерлейкина 4 на мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани 94	Роль сигнального каскада YAP1 в стволовых нишах клеток кожи человека 99
	<i>Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе, Н.В. Короткова, А.А. Крылов, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Стрельникова, И.Ю. Суров, А.Д. Боженова, А.С. Захаров, Н.Д. Нозадзе</i>
	Изучение маркера и медиатора клеточной сенесценции в первичной культуре эндотелиоцитов в ответ на воздействие сосудистых имплантатов 99

<i>А.П. Калинин, Е.С. Зубкова, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова</i>		<i>Д.Н. Каширина, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный, И.М. Ларина, Л.Б. Буравкова</i>	
Влияние стрессорных воздействий на течение аутофагии в мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани	100	Протеомные изменения внеклеточного матрикса, секретомы и клеток при старении МСК и воздействии GDF11	105
<i>Ю.А. Калинина, Н.Н. Павличенко</i>		<i>И.И. Ким, М.А. Суровцева, Н.А. Бондаренко, А.П. Лыков, О.В. Повещенко, Е.В. Чепелева, И.Ю. Журавлева, А.А. Алишевская</i>	
Влияние различных факторов на состояние стволовых клеток пуповинной крови человека ..	100	Интегральный показатель в оценке биосовместимости покрытий из оксинитридов титана, полученных с помощью реактивного магнетронного распыления	106
<i>А.М. Калиниченко, Г.М. Денисенко, А.А. Земеров, А.Л. Файзуллин, П.С. Тимашев</i>		<i>А.Д. Кириллова, Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов</i>	
Muse — метод срочной ex-vivo микроскопии ...	101	Создание тканевого эквивалента хряща на основе матрицы из децеллюляризованного микронизированного суставного хряща свиньи	107
<i>Р.С. Каменцева, М.В. Харченко, Г.В. Габдрахманова, М.А. Котов, Е.С. Корнилова</i>		<i>Е.В. Киселева, Е.В. Батухтина, А.В. Ляндуп</i>	
Динамика деградации рецептора ЭФР в мезенхимных стромальных клетках человека	101	Криохранилище хрящевой ткани как способ сохранить фенотипические характеристики хондроцитов для создания тканеинженерных конструкций	107
<i>М.Н. Карагяур, А.Л. Примак, Е.А. Нейфельд, Е.В. Семина, П.С. Климович, М.Н. Скрябина, Л.М. Самоходская, В.С. Попов, С.С. Джауари, Д.А. Шелег, Б.Д. Цыганков, В.А. Ткачук</i>		<i>Я.Ю. Киселева, Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.М. Шишкин, О.Б. Большакова, Ю.С. Лебедин, В.К. Боженко</i>	
Поиск и установление функции морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием когнитивных и психических расстройств	102	Разработка и доклинические исследования метода CAR-T терапии РЭА-позитивных солидных опухолей	108
<i>Д.В. Карпенко, А.И. Дорофеева, А.Е. Бигильдеев</i>		<i>Е.Н. Кислухина, Н.В. Лизунова, А.М. Сурин, З.В. Бакаева, В.Г. Гинелис</i>	
Эффекты, обнаруженные под действием ФНО α на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) человека, схожи с эффектами деметилирования ассоциированного СРG в промоторе интерлейкина-1 β ММСК здоровых доноров ...	103	Модель фотоиндуцированной ишемии для изучения патологических процессов в зоне пенумбры	108
<i>Д.В. Карпенко, А.Е. Бигильдеев</i>		<i>К.В. Китаева, И.Ю. Филин, А.В. Городилова, Ю.П. Маясин, Ч.Б. Харисова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов</i>	
Взаиморегуляция стволовых и иммунных клеток в тканеспецифичных стволовых нишах .	103	Исследование противоопухолевой активности нагруженных опухоль-специфическими антигенами дендритных клеток in vitro	109
<i>Д.В. Карпенко, А.С. Артюхов, А.Е. Бигильдеев</i>		<i>С.К. Клетухина, М.О. Гомзикова</i>	
Использование самоинактивирующихся лентививекторов третьего поколения для анализа клонального разнообразия и размера клеточных клонов стромальных клеток на модели очагов эктопического кроветворения у мышей	104	Количественная оценка стабильности индуцированных микровезикул при различных условиях хранения	109
<i>Е.К. Карсунцева, А.Д. Воронова, С.С. Андрецова, А.В. Чадин, Г.А. Фурса, О.В. Степанова, В.П. Чехонин</i>		<i>П.С. Климович, В.С. Бойченко, К.А. Рубина, О.И. Ивашкина, К.А. Торопова, К.В. Анохин, Е.В. Семина</i>	
Разработка модели болезни Альцгеймера и ее валидация с помощью поведенческих тестов на крысах	104	Урокиназный рецептор и тканевой активатор плазминогена как гены раннего ответа при формировании когнитивных функций	110
<i>Н.В. Католикова, Д.Д. Шафранская, А.Д. Пржибельский, Р.Р. Гайнетдинов, А.Б. Малашичева</i>		<i>П.С. Климович, С.Э. Мирзаева, В.Ю. Сысоева, Е.В. Семина, К.А. Рубина</i>	
Оценка эффектов ингибирования сигнального каскада Notch на дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в предшественники дофаминергических нейронов	105	Роль T-кадгерина в адипогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток	110

<i>И.И. Кобякова, М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, Д.Д. Линькова</i> Раневые покрытия: оценка возможности применения при клеточной терапии 111	<i>Е.П. Колеватых</i> Создание препарата с регенеративными свойствами на основе вторичных метаболитов пробиотических штаммов бактерий рода <i>Bifidobacterium</i> при культивировании с перфтордекалином 116
<i>А.В. Ковалев, М.М. Сморгчов, Е.В. Кудан, В.А. Мионов</i> Биоискусственная надкостница на основе клеточных сфероидов, полученная методом биопечати 111	<i>В.А. Колесникова, А.В. Ревещин, Д.Ю. Усачев, А.М. Копылов, Г.В. Павлова</i> CD133 ⁺ и CD133 ⁻ клетки глиобластомы человека и их устойчивость к воздействию антипролиферативными и нейроиндукторными факторами 116
<i>А.В. Ковалев, В.К. Ильина, М.М. Сморгчов, Е.В. Прохорова</i> Гетеросфероид с ядром из деминерализованного костного матрикса для стимуляции костной регенерации 112	<i>Е.М. Кондаурова, А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко</i> Серотониновый 5-HT _{1A} рецептор в аутистически-подобном поведении: роль серотониновой и BDNF систем 117
<i>В.В. Ковалева, Н.М. Кузнецов, Е.П. Банин, А.Е. Крупнин, С.В. Крашенинников, С.Н. Чвалун</i> Диэлектрические эластомерные материалы на основе полидиметилсилоксана для имплантатов сердечной мышцы 112	<i>А.А. Кондратенко, Д.В. Товпеко, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов</i> Тканеинженерный продукт из пуповины человека для заживления ран 118
<i>П.А. Ковалева, И.О. Парий, Р.А. Сурменев, Ф.С. Сенатов</i> Эффект памяти формы гибридных электроспиннингованных скаффолдов на основе полилактида, функционализированных восстановленным оксидом графена, для тканевой инженерии 113	<i>И.В. Копылова, К.С. Майорова, В.А. Вигонт, Д.А. Грехнев, А.Н. Богомазова, О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова</i> Влияние мутации G2019S в киназе LRRK2 на функциональное состояние митохондрий и митофагию в измененной клеточной модели болезни Паркинсона 118
<i>Е.И. Коваленко, Н.А. Алексеева, М.А. Стрельцова</i> HLA-E-экспрессирующие вспомогательные клетки для стимуляции экспансии НК-клеток .. 114	<i>Е.С. Корнилова, М.В. Харченко, Р.С. Каменцева</i> Роль рецептора эпидермального роста и его лигандов в регуляции функционирования эндометриальных стромальных клеток человека 119
<i>О.А. Коваль, А.А. Нуштаева, М.М. Бирюков, О.А. Троицкая, Д.Д. Новак, Т.А. Гайнер, Е.В. Милахина, Д.Э. Закревский, В.В. Атаманов, Н.В. Кононова, М.Е. Соболева, В.Р. Мун, В.В. Черных, И.В. Швейгер</i> Клеточная линия увеальной меланомы для моделирования метастатических поражений центральной нервной системы 114	<i>Е.Р. Корчагина, Н.С. Волошин, К.Ю. Кулебякин</i> Малая субпопуляция клеток, несущих на поверхности инсулиновый рецептор, регулируют адипогенную дифференцировку ... 119
<i>О.С. Кожевникова, А.А. Шкляр, А.С. Дербенева, И.Ф. Никулич, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова</i> МикроРНК как маркеры ответа на лечение неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации: пилотное исследование 115	<i>Е.С. Костандян, А.Р. Сатаева, С.А. Цырульников, Т.С. Серегина, В.А. Дятлов</i> Модифицированная карбоксиметилцеллюлоза для создания костных паст-филлеров 120
<i>И.В. Кожухарова, Л.Л. Алексеенко, О.Г. Люблинская, А.П. Домнина</i> 3D культивирование усиливает ангиогенный эффект VEGF, секретируемого эндометриальными мезенхимными стволовыми/стромальными клетками человека 115	<i>А.А. Костенников, И.М. Кабдеш, Д.Х. Сабиров, А.В. Тимофеева, Я.О. Мухамедшина</i> Системное введение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани, способствует восстановлению двигательной функции и стимулирует миелинизацию 120
<i>А.А. Кокорина, Т.В. Мосогутов, Д.А. Решеткина, В.Н. Александров</i> Исследование биоинтеграции децеллюляризированной ткани ксеногенного происхождения при гетеротопической имплантации 115	<i>Д.А. Костина, А.А. Лобов, Е.С. Громова, В.В. Карелкин, Д.В. Смирнова, А.Б. Малашичева</i> Исследование влияния повышенной экспрессии RUNX2 на дифференцировку остеобластов человека 121

<i>Е.Г. Костоломова, Ю.Г. Суховой, И.Г. Унгер, Т.В. Акунеева</i> Резидентные Т-клетки человека в заживлении острых и хронических ран	121	<i>А.Д. Кручинина, Ю.А. Глумскова, А.А. Венедиктов</i> Изучение свойств коллагеновых матриц на основе перикарда	127
<i>Н.В. Костюк, М.Б. Белякова, М.В. Черноруцкий, М.Б. Петрова</i> Изучение взаимного влияния клеток жировой ткани, находящихся на разных стадиях адипогенной дифференцировки	122	<i>А.А. Крылов, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.С. Пшенников, Н.Д. Мжаванадзе</i> Динамика маркеров ангиогенеза у пациентов с облитерирующим атеросклерозом после выполнения реконструктивно- восстановительных оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей	127
<i>М.А. Котова, Е.Я. Шевела, Т.Р. Глебова, Н.А. Ница, Г.А. Ахметова, Ю.А. Кожевников, И.В. Меледина, Е.Р. Черных</i> Стромально-васкулярная фракция липоаспирата в режиме монотерапии и сочетанного использования с препаратом гиалуроновой кислоты в лечении гонартроза ..	122	<i>Е.А. Кувшинова, Н.В. Петракова, С.А. Ахмедова, В.А. Кирсанова, И.К. Свиридова, Н.С. Сергеева, В.С. Комлев</i> Цисплатин-содержащий остеопластический материал на основе ОКФ и бисфосфоната — биоактивность и терапевтические свойства ...	128
<i>А.В. Котова, А.А. Лобов, Ю.А. Домбровская, Е.М. Приходько, В.И. Санникова, Н.А. Рюмина, П. Клаузен, А.Л. Шаварда, А.Б. Малашичева, Н.И. Енукашвили</i> Сравнительный анализ стволовых клеток пульпы и периодонта	123	<i>С.М. Кузин</i> Пространственная ниша и временное окно — необходимые условия поддержания генетической стабильности стволовых клеток .	128
<i>С.В. Кравченко, В.В. Мясникова, С.Н. Сахнов</i> Модификация альгинатного гидрогеля углеродными нанотрубками	123	<i>Е.В. Кузнецова, Ю.А. Пучкова, Е.В. Ястремский, А.В. Бакиров, С.Н. Чвалун</i> Биосовместимые полимерные наночастицы на основе лактида и оксида этилена для тканевой инженерии	129
<i>Н.А. Красковская, М.Г. Хотин, Н.А. Михайлова</i> Разработка клеточной модели на основе трансдифференцировки дермальных фибробластов в индуцированные нейроны для изучения патогенеза болезни Хантингтона	124	<i>А.А. Кузьмин, В.В. Кудряшов, А.Н. Томилин</i> Экспрессия гена <i>POU5F1</i> в раковых клетках мышы	129
<i>М.С. Краснов, А.П. Ильина, А.И. Шайхалиев, Е.В. Сидорский, В.П. Ямскова, В.И. Позинский</i> Эпиморфная регенерация костной ткани при применении 3D-криогелей, содержащих биорегулятор, выделенный из сыворотки крови быка	124	<i>К.А. Кулакова, О.А. Краснова, Д.А. Костина, А.П. Домнина, Ю.В. Сопова, И.Э. Неганова</i> Функциональное значение кальций- чувствительного рецептора (CaSR) в патогенезе остеопороза	130
<i>Е.О. Кривкина, А.В. Миронов, А.Р. Шабаетов, М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, Е.А. Сенокосова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш</i> Тканеинженерный сосудистый протез малого диаметра: результаты преклинических испытаний на модели овцы	125	<i>К.Ю. Кулебякин, Е.Р. Корчагина, Н.С. Волошин, И.А. Скляник, Е.А. Шестакова</i> Регуляторные популяции МСК и их роль в контроле гормональной чувствительности жировой ткани	130
<i>П.А. Крохичева, М.А. Гольдберг, В.С. Комлев</i> Исследование свойств костных цементов на основе системы фосфат кальция-фосфат магния с антибактериальным эффектом для применения в реконструктивно- восстановительной хирургии	125	<i>М.А. Кулебякина, Д.А. Бутузова, М.С. Арбатский, Н.А. Басалова, О.И. Клычников, А.Ю. Ефименко</i> Идентификация белковых компонентов, регулирующих дифференцировку фибробластов, в составе фракций секрета МСК	131
<i>А.Е. Крупнин, И.А. Чичаев, С.В. Крашенинников, М.М. Алексанян, О.А. Спирин, Н.Г. Седуш, С.Н. Чвалун</i> Применение гиридных PLA-скаффолдов для замещения дефектов костных тканей	126	<i>О.Р. Куликова, Е.О. Осидак, К.Г. Антипова, С.В. Крашенинников, Д.Ю. Бедник, Т.Е. Григорьев, Е.А. Храмова</i> Бесконтактный метод мониторинга механических свойств гидрогелевых матриц на основе коллагена для тканевой инженерии	131
		<i>О.Б. Кулясова, Г.С. Дьяконов, Р.З. Валиев</i> Наноструктурные биорезорбируемые сплавы на основе магния и цинка для временных имплантатов	132

<i>С.В. Курбангалеева, М.О. Гомзикова</i> Способность мононуклеарных клеток периферической крови поглощать индуцированные микровезикулы	132	<i>М.И. Лукашина, П.Н. Вихрева, М.Д. Моллаев, А.В. Посвятенко, А.В. Кибардин, М.А. Масчан, С.С. Ларин</i> Масштабная экспансия функционально активной популяции НК-клеток для иммунотерапии онкологических заболеваний .	138
<i>А.Д. Куренкова, D. Trompet, B. Zhou, А.П. Усанова, T.L. Chu, A. Age, M. Kasper, А.С. Чагин</i> Активация сигнального пути hedgehog в эпифизарных стволовых клетках увеличивает рост кости	133	<i>Е.А. Лунев, Н.В. Клементьева, И.М. Савченко, А.А. Карань, М.А. Дженкова, Т.В. Егорова, М.В. Бардина</i> Генная терапия на основе микрорнк для GNAO1-энцефалопатии с доминантно-негативным вариантом C.607 G>A	138
<i>М.А. Кутырев, Е.И. Шишацкая, Е.В. Скорб, С.А. Уласевич</i> Формирование паттерна из гидроксиапатита в матрице бактериальной целлюлозы	133	<i>А.Ю. Лупатов, А.М. Гисина, Я.С. Ким, С.Е. Новикова, Д.М. Поташникова, Л.К. Курбатов, И.В. Холоденко, А.В. Творогова, К.Н. Ярыгин</i> CD133 как маркер раковых стволовых клеток колоректальной аденокарциномы: молекулярные особенности и регуляция экспрессии	139
<i>И.Н. Левченко, Г.К. Владимиров, И.В. Володяев</i> Изменение структуры и функции цитохрома с при взаимодействии с кардиолипином: структура белка, его пероксидазная активность и свободно радикальные процессы	134	<i>А.П. Лыков, М.А. Суровцева, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким, Ю.С. Гаврилова, О.В. Повещенко</i> Эритропоэтин как активатор аутофагии в мезенхимных стволовых клетках	139
<i>А.И. Лебедева, С.А. Афанасьев, Е.М. Гареев, Д.С. Кондратьева, С.А. Муслимов, С.В. Попов</i> Влияние аллогенного биоматериала на криогенный рубец миокарда	135	<i>А.П. Лыков, М.А. Суровцева, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким, Ю.С. Гаврилова, Н.П. Бгатова, О.В. Повещенко</i> Влияние эритропоэтина на функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток in vitro	140
<i>О.Ю. Лисина, И.А. Красильникова, Р.Р. Шарипов, М.В. Балясин, В.Г. Пинелис, З.В. Бакаева, А.М. Сурин</i> In vitro моделирование механического повреждения мозга на первичных нейро-глиальных и астроцитарных культурах из мозга крысы	135	<i>И.В. Лядова, Т.А. Ненашева, О.Н. Шевелева, Е.В. Григорьева, С.П. Медведев</i> Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки как источник для получения клеток врожденного иммунитета человека	140
<i>Ю.Ю. Литвинов, В.П. Панин, В.В. Краснов</i> Получение биосовместимых имплантационных материалов с антибактериальными свойствами с использованием средств растительного происхождения	136	<i>А.С. Магнаева, Т.И. Баранич, А.А. Гофман, Д.Н. Воронков, В.С. Сухоруков</i> Иммуногистохимическая оценка митохондриальных и аутофагоцитарных маркеров при старении головного мозга человека	141
<i>А.А. Лобов, Д.С. Семенова, И.А. Тараскин, Д.А. Костина, А.А. Ивашкин, И.А. Хворова, К.В. Данько, Б.Р. Зайнуллина, В.В. Карелкин, Л.Г. Данилов, В.Е. Успенский, А.Б. Малашичева</i> Молекулярные механизмы остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана	136	<i>В.Е. Майорова, М.Д. Моллаев, П.Н. Вихрева, Е.А. Кулаковская, Д.Е. Першин, А.В. Кибардин, М.А. Масчан, С.С. Ларин</i> Безантительный химерный рецептор FLT3-SAR для таргетирования тирозинкиназного рецептора FLT3 — маркера плохого прогноза при остром миелоидном лейкозе	141
<i>П.Б. Лозовая, Е.Д. Полянских, Е.Г. Костоломова</i> Иммунофизиологические механизмы регенерации ран в условиях применения супернатанта пробиотических бактерий <i>Bifidobacterium Bifidum</i>	137	<i>С.А. Макаров, А.Г. Аганесов, М.М. Алексанян, В.А. Демина, О.А. Спириин</i> Биосовместимое устройство для укрывания дефекта фиброзного кольца в поясничном отделе позвоночника после секвестрэктомии ...	142
<i>К.И. Луканина, Н.А. Шарикова, П.М. Готовцев, Т.Е. Григорьев</i> Перспективный электропроводящий материал для остеоиндукции на основе ацетат целлюлозы с PEEDOT:PSS	137	<i>С.В. Макаров, Н.Х. Муселимян</i> Вклад регенеративной медицины в терапию аутоиммунных заболеваний нервной системы ..	142

<i>О.Г. Макеев, С.В. Костюкова, А.В. Коротков, С.Б. Антонова</i> Подход к генотерапии аутоиммунных заболеваний	143	<i>П.А. Марков, И.И. Виноградов, Е. Костромина, П.С. Еремин, И.Р. Гильмутдинова, А.П. Рачин, А.Н. Нечаев</i> Использование ионно-трековой мембраны модифицированной хитозан-коллагеновыми нановолокнами в качестве средства доставки лекарственных средств	149
<i>О.Г. Макеев, Е.А. Шуман, А.В. Коротков, М.А. Десятова, М.А. Уфимцева</i> Гиперэкспрессия гена <i>Klotho</i> сопровождается снижением проявлений атопического дерматита	144	<i>Д.К. Матвеева, Д.Н. Каширина, М.И. Ездакова, А.Ю. Ратушный</i> Изменение внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при старении <i>in vitro</i>	149
<i>А.В. Макрушин</i> О природе рака с точки зрения эволюционной медицины	144	<i>И.В. Матвейчук, В.В. Розанов</i> Способы увеличения объёма системы внутрикостных пространств для повышения скорости остеоинтеграции	150
<i>А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно, А.А. Останин, Е.Р. Черных</i> Репаративный потенциал М2 макрофагов, поляризованных в результате эффероцитоза .	145	<i>С.С. Махотин, С.В. Сдобникова</i> Новый подход к изучению неоангиогенеза при диабетической ретинопатии	150
<i>П.Е. Максимова, Е.А. Непритимова, Д.В. Зима</i> Молекулярные механизмы онкотрансформации тиреоидного эпителия ...	145	<i>К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Е.А. Солоп, С.Б. Базлов, И.И. Карташевский</i> Оценка биосовместимости материала на основе дермы для герниопластики	151
<i>С.Н. Малахов, М.А. Евтеева, А.В. Родина, М.М. Алексанян, А.Г. Аганесов, С.Н. Чвалун</i> Влияние способа электроформования нетканых материалов из полиамида-6 на адгезию и пролиферацию клеточных культур	146	<i>К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, И.В. Супрун, А.С. Асякина, Я.А. Козмай, А.А. Козлова</i> Оценка цитотоксичности репаративного гидрогеля на основе дермы свиньи	151
<i>А.А. Малахова, В.С. Макеева, С.П. Медведев, С.М. Закиян</i> Подход к изучению протеинопатий, вызванных экспрессией мутантного белка Хантингтин	146	<i>А.Г. Мензоров, И.Е. Пристяжнюк, Н.И. Мещеряков, Т.В. Никитина, Е.Н. Толмачева, Л.И. Минайчева, Л.П. Назаренко, И.Н. Лебедев</i> Получение ИПСК из фибробластов пациентки с микроделецией XQ24	152
<i>А.Б. Малашичева, А.А. Лобов, Д.А. Переплетчикова, Д.А. Костина</i> Молекулярные и клеточные механизмы управления остеогенной дифференцировкой ..	147	<i>С.Э. Мирзаева, М.А. Лазарев, Е.А. Сотская, П.С. Климович, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева</i> Субпопуляция нестин экспрессирующих клеток выполняет регуляторную функцию в ходе адипоцитарной дифференцировки МСК жировой ткани	152
<i>Д.В. Мальчикова</i> Повышение остеоиндуктивных свойств скаффолда для устранения костных дефектов челюстей критических размеров	147	<i>В.М. Михайлов, А.В. Соколова</i> Появление синтеза дистрофина у мышей MDX после немиелоаблативной трансплантации клеток костного мозга мышей СЗНА	152
<i>Е.А. Маркина, П.И. Бобылева, И.В. Андрианова, Е.А. Тырина, Л.Б. Буравкова</i> Сравнительный анализ влияния 14-суточного антиортостатического вывешивания на стромальные предшественники костного мозга и костной ткани бедренной и большеберцовой костей крыс линии W1STAR	148	<i>М.М. Михайлова, К.В. Сидорук, Л.И. Давыдова, Е.В. Ястремский, С.Н. Чвалун, В.Г. Дебабов, В.Г. Богуш, А.А. Пантелеев</i> Матрикс на основе рекомбинантных спидроинов — эффективная основа для культивирования <i>ex vivo</i> как нервной ткани (дорсальные ганглии), так и сосудистой системы (фрагменты аорты)	153
<i>П.А. Марков, И.И. Виноградов, Е. Костромина, П.С. Еремин, И.Р. Гильмутдинова, А.П. Рачин, А.Н. Нечаев</i> Биофункциональные свойства ионно-трековой мембраны модифицированной хитозан- коллагеновыми нановолокнами	148		

<i>С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, В.А. Труонг, М.Ю. Меньшиков, Ю.Ч. Ху, Е.В. Парфёнова</i> Трансплантация адипоцитарной тканеинженерной конструкции с CRISPR-опосредованной активацией экспрессии UCP1	154	<i>М.С. Мызина, А.А. Нестерова, М.А. Иванов, А.А. Калинин, А.А. Бочаров, Г.М. Юсубалиева</i> Противоопухолевая эффективность TIL-V в отношении глиобластомы	158
<i>И.В. Мозговой, И.Б. Филиппенков, Ю.А. Ремизова, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, Л.В. Губский, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова</i> Дифференциальная экспрессия микроРНК в условиях модели церебральной ишемии у крыс при использовании контралатерального полушария в качестве контроля: избыточные и упущенные результаты	154	<i>С.В. Надеждин, Д.В. Маклаков, М.П. Фомина, Г.А. Новиков</i> Реакция мезенхимных стволовых клеток на топографию поверхности композитных матриц на основе poly-D-L-lactide-co-glycolide	159
<i>В.О. Мокроусова, И.А. Недорубова, А.Ю. Меглей, А.В. Васильев, Т.Б. Бухарова, Д.В. Гольдштейн</i> Влияние нестероидных противовоспалительных средств на аденовирусную трансдукцию культур ММСК	155	<i>Н.А. Надеждина, Д.В. Маклаков, Д.А. Мовчан, М.В. Покровский, Ю.Е. Бурда</i> Влияние рекомбинантного эритропоэтина человека на пролиферацию и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток	160
<i>А.О. Монакова, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, В.С. Попов, В.Ю. Балабаньян, А.Ю. Ефименко</i> Локальное введение секретомы мезенхимных стромальных клеток снижает количество M2 макрофагов в моделях повреждения сперматогенеза	155	<i>В.С. Науменко, Е.М. Кондаурова, Т.В. Ильчибаева, Н.К. Попова</i> Транскрипционный фактор FREUD-1 в регуляции аутистически-подобного поведения: роль 5-HT1A и D2 рецепторов, а также CREB- и NF-κB-зависимых сигнальных путей	160
<i>Я.В. Морозова, С.И. Рябов, С.М. Радаев, В.А. Смирнов, А.А. Гринь, Д.А. Емелина, Ж.Б. Семенова, А.Б. Смулевич</i> Клиническое применение мононуклеарных клеток пуповинной крови в психиатрии и неврологии	156	<i>Ю.А. Нащеккина, М.С. Сироткина, Н.А. Михайлова</i> Коллагены различных типов в клеточных технологиях	161
<i>Е.Ю. Москалева, А.В. Родина, А.С. Жирник, О.Д. Смирнова, О.В. Высоцкая, А.А. Парфёнова, Ю.П. Семочкина</i> Регуляция количества клеток микроглии в мозге мышей с помощью пексидартиниба для предотвращения когнитивных нарушений после облучения	156	<i>И.А. Недорубова, В.О. Мокроусова, А.Ю. Меглей, В.П. Басина, Т.Б. Бухарова, Д.В. Гольдштейн</i> In vitro исследование свойств ген-активированных матриц на основе коллагена и фибрина	161
<i>А.И. Муллагулова, А.А. Шаймарданова, В.В. Соловьева, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.А. Ризванов</i> Анализ функциональности и биораспределения в нервной системе свиней аденоассоциированного вируса серотипа OligO01, кодирующего кДНК гена арилсульфатазы А	157	<i>А.А. Некрасова, А.Е. Згодова, М.М. Гончаров, В.Г. Пинелис, С.Е. Бадмаева, З.В. Бакаева</i> Влияние трипептида Pro-Gly-Pro на регенерацию нейрональной культуры при механической травме in vitro	162
<i>А.А. Мураев, А.И. Мурзабеков, Е.А. Орлов, Ю.В. Тарасов</i> Плазменное электролитическое оксидирование для формирования поверхности дентальных имплантатов	157	<i>Н.В. Низяева, Э.Ю. Амирасланов, К.А. Артемьева, И.А. Степанова, М.В. Шамаракова, Н.Б. Тихонова</i> Особенности экспрессии рецепторов NOD-1, TLR8, ZBP-1, RIG-1 в миометрии при преэклампсии	162
<i>Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.А. Ризванов</i> Посттравматическая регенерация спинного мозга: основные подходы для решения многогранной проблемы	158	<i>М.Ю. Николаев, П.А. Тюрин-Кузьмин, К.Ю. Кулебякин, Д.А. Найда, М.В. Воронцова</i> Молекулярные механизмы регуляции ПТГ-зависимой кальциевой сигнализации в постнатальных стволовых клетках	163
		<i>Н.А. Николаева, В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев</i> Особенности изменения характеристик костных имплантатов при комбинированной стерилизации	163
		<i>В.А. Николаева, М.И. Камалов, В.В. Часов, Т.И. Абдуллин, К. Даиоб, М. Зухайб</i> Исследование взаимодействия целевых систем доставки на основе пептидов RGD и GHK с гепарином	164

<i>О.В. Никуленкова, А.Е. Крупнин, Д.Г. Брешенков, Э.Р. Чарчян</i> Математическое моделирование гемодинамики при расслоении аорты	164	<i>Г.В. Павлова, В.А. Колесникова, А.В. Ревещин, Д.Ю. Усачев, А.М. Копылов</i> Дифференцировочная терапия — как новый подход к лечению глиомы головного мозга человека	169
<i>П.П. Нимирицкий, Е.С. Новоселецкая, Р.Ю. Еремичев, Н.А. Александрович, Н.А. Басалова, П.И. Макаревич</i> Самоорганизация путем мезенхимальной конденсации в клеточных пластах определяет дифференцировочную судьбу МСК	165	<i>Г.В. Павлова, В.В. Паршина, А.В. Ревещин</i> Разнообразие форм и свойств GDNF: нейропротектор или нейроиндуктор?	170
<i>Ю.А. Новикова, О.С. Роговая, А.Н. Попова, А.Д. Фиошин, Е.А. Воротеляк</i> Исследование влияния криохранения на жизнеспособность клеток кожи и динамику популяции эпидермальных стволовых клеток ..	165	<i>С.А. Павлова, А.В. Голанов, Г.В. Павлова</i> Роль активно мигрирующих клеток глиомы человека в резистентности опухоли к лучевой терапии	171
<i>Е.В. Новосадова, И.А. Гривенников, Д.М. Шимченко, С.А. Антонов, Т.П. Герасимова, Л.В. Новосадова, Е.Л. Арсеньева, Л.И. Давыдова, К.В. Сидорук, В.Г. Богуш, В.З. Тарантул</i> Матрицы из рекомбинантных спидроинов поддерживают рост и дифференцировку нейронов и глиальных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека	166	<i>С.В. Пак, Е.И. Зырянова, Е.П. Банин, Н.М. Кузнецов, А.Е. Крупнин, С.В. Крашенинников, П.В. Дмитрияков, А.А. Пучков, В.В. Ковалева, С.Н. Чвалун</i> Стимул-чувствительные полимерные материалы для поддержания сократительной функции сердца	171
<i>И.К. Норкин, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Малащенко, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова</i> Дифференцировочный потенциал ММСК под влиянием терапевтических доз гепарина	166	<i>А.И. Паламарчук, Е.И. Коваленко, М.А. Стрельцова</i> Выявление факторов, ассоциированных с эффективностью запуска апоптоза химическим индуктором димеризации (CID) в НК-клетках, модифицированных геном индуцируемой каспазы 9 (iCasp9)	172
<i>И.Д. Ожималов, М.Н. Балацкая, В.С. Попов, И.Б. Бродский, Е.В. Семина, М.А. Кулебякина, В.Ю. Сысоева, А.В. Балацкий, К.А. Рубина, Н.И. Калинина</i> Создание животной модели для исследования Т-кадгерин опосредованной регенерации	167	<i>Д.Д. Паншин, А.А. Лобов, А.Б. Малашичева</i> Изучение молекулярных механизмов взаимодействия сигнального пути notch и транскрипционного фактора RUNX2	172
<i>П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Кривокубов, А.В. Громов, А.С. Карягина</i> Применение диопсида в качестве носителя рекомбинантного BMP-2 в составе гибридных имплантатов на основе природных материалов для инженерии костной ткани	167	<i>Б.А. Парамонов, Д.Ю. Андреев, П.В. Ястребов, Д.В. Щеголев, П.В. Апель, А.Н. Нечаев, Н.С. Дмитриев, Р.К. Рагимова, Н.М. Парамонова</i> Перспективы применения трековых мембран для лечения ожогов и ран	173
<i>П.А. Орлова</i> Исследование регенеративных свойств новых вариантов рекомбинантного EPO и BMP- 2 в составе конструкций на основе природных и синтетических материалов	168	<i>Б.А. Парамонов, Е.М. Пожарская, К.В. Сивак, К.И. Стосман, Н.В. Скворцов, А.О. Морозова, Н.М. Парамонова</i> Сравнительная оценка эффективности коллагеназ различного происхождения, применяемых для лечения ожогов и рубцов кожи	173
<i>Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, А.А. Горелова, А.Н. Ремезова, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, Н.В. Заболотных, А.А. Лебедев, П.К. Яблонский</i> Аугментация мочевого пузыря с применением аллогенных тканеинженерных конструкций	168	<i>Н.М. Парамонова, С.В. Чепур, А.В. Смирнова, Б.А. Парамонов, А. Емельянова, А.О. Шпаков</i> Регенерация как естественное индуцированное перепрограммирование?	174
<i>Е.О. Осидак, А.Ю. Андреев, С.П. Домогатский</i> Имплантируемые биомембраны на основе нативного коллагена для клинического применения	169	<i>Е.В. Парфенов, Л.В. Парфенова</i> Биомиметические покрытия на основе плазменно-электролитического оксидирования и функциональных органических молекул для имплантатов из титановых сплавов	174
		<i>Н.А. Пасатецкая, Е.В. Лопатина</i> Остеогенез: роль сигнальной функции Na/K- АТФазы	175

<i>Т.Д. Пацаев, Е.В. Ястремский, А.М. Азиева, Д.А. Кириллова, А.А. Михуткин, К.Г. Антипова, Р.В. Шариков, Н.А. Шарикова, К.И. Луканина, Т.Е. Григорьев, Р.А. Камышинский, А.Л. Васильев</i>	<i>Д.А. Пешкова, Е.С. Головнева, Д.Р. Соляникова</i>
Адгезия и пролиферация клеток линии НЕК 293Т на полимерных матриксах различной морфологии 175	Возрастные особенности влияния тучных клеток на репаративные изменения тироцитов после инфракрасного лазерного воздействия 180
<i>Н.В. Первушин, Д.Р. Базанов, В.Ю. Савицкая, Е.В. Савин, Н.А. Лозинская, Г.С. Копеина</i>	<i>Е.С. Пигусова, А.К. Судьина, А.А. Рамонова, А.Ю. Архипова, В.Г. Богуш, И.В. Бессонов, К.В. Шайтан, А.М. Мойсенович</i>
Оценка биологической активности производных имидазолина в качестве ингибиторов MDM2 176	Остеоиндуктивная активность композитных материалов на основе фотоотверждаемых производных фиброина шелка 180
<i>К.И. Перепелина, А.К. Зайцева, А.А. Худяков, И.Э. Неганова, А.А. Костарева, А.Б. Малашичева</i>	<i>Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Л.Т. Волова, Е.В. Тимченко, А. Тчанг, И. Лемба</i>
Моделирование ламин-ассоциированной кардиомиопатии на модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток 176	Оценка безопасности и эффективности минерального компонента кости в патогенетических моделях остеорезорбции ... 181
<i>Д.А. Переплетчикова, Д.А. Костина, И.А. Хворова, В.В. Карелкин, А.А. Лобов, А.Б. Малашичева</i>	<i>С.В. Плегунова</i>
Изучение влияния эндотелиальных клеток на процессы остеогенной дифференцировки .. 177	Исследование биосовместимости магниевых биорезорбируемых сплавов систем Mg-Zn-Ga и Mg-Zn-Mn-Ca 181
<i>П.В. Перетягин, А.Г. Соловьева, Н.Л. Короткова, Н.В. Диденко, К.Л. Беляева, В.И. Загреков</i>	<i>Н.С. Покровский, М.А. Водякова, Е.В. Мельникова</i>
Регенерация кожных покровов после ожоговых травм под воздействием гипербарической оксигенации 177	Разработка стратегии валидации методики автоматического подсчета клеток 182
<i>Н.А. Петинати, Н.И. Дризе, Г.Л. Арапиди, В.О. Шендер, М.А. Лагарькова, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко</i>	<i>А.Г. Полешко, С.И. Михалевич, С.А. Креер, И.Д. Волотовский</i>
Сравнительный протеомный анализ секретома мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, использованных для профилактики реакции трансплантат против хозяина после трансплантации аллогенного костного мозга 178	Регенеративный потенциал мезенхимальных стромальных клеток в аспекте лечения послеоперационного рубца матки 182
<i>Е.С. Петрова, Е.А. Колос</i>	<i>Р.А. Полтавцева, А.Ю. Пульвер, Н.А. Пульвер, Е.В. Свирщевская</i>
Изучение IVA-1-иммунопозитивных клеток в седалищном нерве крысы после наложения лигатуры и субперинеурального введения МСК 178	Разработка биоткани на основе термочувствительного биогеля для терапии синдрома Ашермана 183
<i>В.Л. Петрова, А.Р. Сираева, И.И. Гайнуллин, Р.Х. Ахметов, И.С. Минязева, К.Р. Яппарова, Д.А. Трофимов, В.А. Маркосян, Р.Р. Исламов, З.З. Сафиуллов</i>	<i>А.Ю. Полянская, Е.Р. Павлова, М.В. Волкова В.В. Бояринцев, А.В. Трофименко, Г.И. Фильков, Д.В. Багров, Д.В. Клинов, М.О. Дурыманов</i>
Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на ремоделирование нейроглии в головном мозге мини-свиней с ишемическим инсультом 179	Получение 3D модели кожи путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов 184
<i>М.А. Петровская, М.Б. Петрова, Е.В. Андрианова, Е.Н. Егорова</i>	<i>А.В. Полянская, А.С. Мусорина, Г.Г. Полянская, Д.Е. Бобков</i>
Динамика уровней цитокинов в регенерирующих тканях термических ожогов кожи крыс при применении мази с новым производным N-ацетиламиногексановой кислоты 179	Влияние LPA и Y-27632 на среднюю скорость миграции клеток FETMSC, находящихся на различных стадиях репликативного старения 184
	<i>А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева</i>
	Оценка жизнеспособности, цитокинового профиля и генов плюрипотентности в клетках колонофер после взаимодействия с опухолевыми и стволовыми везикулами 184
	<i>А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, А.О. Никольская, З.З. Гоникова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов</i>
	Тканевой эквивалент эндокринного отдела поджелудочной железы 185

<i>Ю.В. Пономарева, Н.Н. Сарбаева, В.И. Белоконев, М.Н. Милякова, М.В. Королев</i> Структурные изменения и формирование мезотелия на поверхности ацеллюлярного матрикса при имплантации на десерозированную стенку желудка крысы ...	185	<i>Е.В. Пресняков, Н.И. Жемков, П.С. Подлужный, В.В. Церцейл, Е.С. Рочев, И.Я. Бозо, Р.В. Деев</i> Влияние ген-активированного материала на регенерацию гиалинового хряща и субхондральной кости в эксперименте in vivo	191
<i>А.И. Пономаренко, И.В. Манжуло</i> Реактивный астроглиоз при черепно-мозговой травме легкой степени тяжести и терапии синаптамидом	186	<i>А.П. Призов, И.И. Еремин, А.А. Никитин, Н.В. Загородний, Ф.Л. Лазко, Е.А. Беляк, М.Ф. Лазко</i> Сравнительное исследование эффективности применения SVF и PRP в лечении медиального остеоартрита коленного сустава в комбинации с высокой тиббиальной остеотомией	192
<i>Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.А. Степанов, К.А. Артемьева, Н.Б. Тихонова</i> Фракционирование сперматогенных клеток мышцы в линейном градиенте фиколла	186	<i>А.Л. Примак, Н.А. Басалова, М.Н. Скрябина, А.Е. Толстолужинская, А.Ю. Ефименко, М.Н. Карагяур</i> Адаптация технологии транс-сплайсинга для создания клеточных моделей	193
<i>А.Л. Попов, И.В. Савинцева, Н.Н. Чукавин, В.К. Иванов</i> Перспективы биомедицинского применения органо-неорганических нанокомпозитов на основе оксида церия в сфере регенеративной медицины	187	<i>К.А. Проняева, Л.Ш. Шаяхметова, Е.В. Дементьева, С.В. Павлова</i> Моделирование гипертрофической кардиомиопатия с помощью направленной дифференцировки ИПСК с мутацией p.Asn515del в гене MYBPC3 в кардиомиоциты in vitro	193
<i>Д.В. Попов, П.А. Махновский, А.А. Борзых, Е.М. Леднев, Т.Ф. Велхвядзе, Н.С. Курочкина, Е.С. Томиловская, О.И. Орлов</i> Поиск транскрипционных факторов, регулирующих транскриптом скелетной мышцы человека при резком снижении двигательной активности	188	<i>Т.Е. Пылаев, Е.С. Авдеева, Н.Г. Хлебцов</i> Система лазерной трансфекции клеток с использованием слоев наночастиц золота для контролируемой доставки генов	194
<i>О.Е. Поповкина, Л.Ю. Гривцова</i> Трансплантация кардиомиобластов пожилым пациентам с кардиотоксическими эффектами химиотерапии	188	<i>А.В. Раднаева, П.И. Макаревич, М.А. Болдырева, Е.В. Парфёнова</i> Изучение механизмов фармакологической активности нового бицистронного генотерапевтического препарата на основе плазмиды с генами VEGF165 и HGF человека	194
<i>Т.Н. Попырина, Т.С. Демина, Т.А. Акопова</i> Материалы для биомедицины на основе производных и сополимеров хитозана	189	<i>А.А. Расторгуева, Т.А. Астрелина, В.А. Брунчуков, Ю.Б. Сучкова, И.В. Кобзева, Д.Ю. Усупжанова, Е.Е. Ломоносова, В.А. Никитина, В.А. Брумберг, А.М. Комлев, А.С. Самойлов</i> Эффективность применения МСК крыс и человека и их кондиционированных сред при местных лучевых поражениях на модели лабораторных животных	195
<i>М.О. Порошина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева</i> Влияние сукцината на дифференцировку клеток C2C12	189	<i>Т.С. Расулов, П.С. Тимашев, П.И. Котенева, Н.В. Кошелева, А.Л. Файзуллин, Т.В. Брайловская, А.П. Ведяева</i> Разработка новой тканеинженерной конструкции с применением генно- терапевтического препарата «Неоваскулген» для повышения эффективности дентальной имплантации	195
<i>М.П. Потапнёв, С.И. Кривенко, В.Г. Богдан, Ф.Н. Карпенко, А.Б. Михновская, В.И. Асаевич</i> Приготовление и медицинское применение препаратов растворимых факторов тромбоцитов человека	190	<i>А.Ю. Ратушный, Д.К. Матвеева, М.И. Ездакова</i> Влияние GDF11 на морфофункциональные характеристики мезенхимальных стромальных клеток при старении	196
<i>М.П. Потапнев, С.М. Космачева, Л.А. Репина, А.Г. Ионова, Н.В. Гончарова, Ю.Н. Рушкевич, С.А. Лихачев, Т.В. Докукина, Ф.П. Хлебоказов</i> Системное vs локальное введение мезенхимальных стромальных клеток для терапии нейродегенеративных заболеваний человека	190		
<i>В.Р. Потапова, И.В. Гилевич, Е.А. Коломийцева</i> Анализ влияния саплиментов на пролиферативную активность и жизнеспособность фибробластов человека ...	191		

<i>М.Г. Ратушняк, А.С. Жирник, А.А. Парфёнова, Ю.П. Семочкина, О.Д. Смирнова</i> Предотвращение отдаленных когнитивных нарушений у мышей после гамма-облучения головы с помощью интраназального введения экзосом нейральных стволовых клеток 196	<i>В.М. Рябов, М.М. Барышев, М.А. Воскресенский, Б.В. Попов</i> Клетки ранних стромальных пассажей из опухолевой ткани предстательной железы и производные органоидные культуры экспрессируют тканеспецифические эпителиальные и опухолевые маркеры 202
<i>М.Г. Ратушняк, Д.А. Шапошникова, О.В. Высоцкая, Ю.П. Семочкина</i> Регуляция экспрессии генов провоспалительных цитокинов в клетках активированной микроглии под действием нейральных стволовых клеток и их экзосом ... 197	<i>Д.Х. Сабиров, Э.Ф. Давлетшин, А.В. Тимофеева, Т.В. Повышева, Я.О. Мухамедшина</i> Влияние двигательной реабилитации на экспрессию NG2 протеогликана при травме спинного мозга крысы 202
<i>И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Е.Я. Шевела</i> Растворимые факторы макрофагов человека стимулируют пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих ишемию in vitro 197	<i>А.А. Савченкова</i> Клетки с фенотипом подобным мезенхимным стволовым из подкожного жира животных для изучения <i>Sarcoptes Scabiei/Mange</i> 203
<i>Ю.А. Ремизова, О.Ю. Сударкина, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова, И.Б. Филиппенков</i> Сверхэкспрессия циклической РНК гена <i>SGMS1</i> человека для изучения ее взаимодействий с малыми РНК 198	<i>А.В. Садовская, Н.А. Петинати, Н.М. Капранов, Н.И. Дризе, А.Н. Васильева, О.А. Алешина, Е.Н. Паровичникова</i> Изменения свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток у пациентов с острыми лейкозами 203
<i>С.А. Родимова, Н.В. Бобров, И.Д. Щечкин, Д.П. Крылов, Д.С. Козлов, В.В. Елагин, М.М. Карabut, А.М. Можеров, В.Е. Загайнов, Е.В. Загайнова Д.С. Кузнецова</i> Метаболический имиджинг ткани печени в процессе регенерации при наличии сопутствующих печеночных патологий 199	<i>С.В. Сазонов</i> Некоторые закономерности пролиферации клеток при старении организма и при развитии патологии 204
<i>А.Я. Родный, К.А. Молобекова, Е.М. Кондаурова, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова, В.С. Науменко</i> Протективное действие препарата амисульприд на гиперфосфорилирование Тау-белка в модели спорадической болезни Альцгеймера — крыс линии OXYS 199	<i>Е.В. Самойлова, Д.А. Чепурнова, А.Г. Фесенко, А.А. Коротаева</i> Регуляция активности металлопротеиназы меприна как способ влияния на регенеративные процессы 204
<i>М.В. Руснак, Л.И. Калюжная, А.А. Кондратенко, Д.В. Товпеко</i> Анализ состава гидрогеля из внеклеточного матрикса пуповины человека 200	<i>А.С. Светозаров, Р.А. Абрамович, О.Г. Потанина, И.В. Шарутин, А.Н. Воробьев, О.В. Меньшова, Е.В. Елизарова</i> Коктейльная тест-система для рациональной фармакотерапии 205
<i>В.А. Рыбачук, Н.В. Михайловский, Л.И. Попова, А.П. Петрикина, Е.В. Абакушина</i> Иммунофенотип NK-клеток при длительном культивировании мононуклеарных клеток 200	<i>А.В. Свирская, М.А. Яковлева, Б.А. Музыченко, Д.Б. Нижегородова</i> Влияние гипоксии на окислительные реакции фагоцитов в ко-культуре с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками .. 205
<i>И.И. Рюмина, Д.Н. Силачев, Н.М. Марычева, Д.Ю. Трофимов, Ю.Ю. Коталевская, В.В. Зубков, Г.Т. Сухих</i> Использование перинатальных стволовых клеток в комплексном лечении врожденного буллезного эпидермолиза 201	<i>М.В. Свистушкин, А.А. Бакулина, проф. С.В. Старостина, проф. А.Б. Шехтер, А.И. Шпичка, А.Л. Файзуллин, А.В. Золотова, А.Н. Никифорова, проф. В.М. Свистушкин, П.С. Тимашев</i> Применение мезенхимных стромальных клеток человека в реконструкции голосовых складок 206
<i>М.Г. Рябков, М.Н. Егорихина, И.Ю. Арефьев, И.Н. Чарыкова, Н.А. Колошеин, А.Е. Богданова, А.О. Московченко, Н.Г. Засецкая</i> Использование стромально-васкулярной фракции жировой ткани для лечения пациентов с термическими ожогами 201	<i>Н.Г. Седуш, А.Е. Крупнин, Е.П. Банин, М.М. Алексанян, А.Г. Аганесов, С.Н. Чвалун</i> Персонализированный подход к созданию и изготовлению биоразлагаемых кейджей с применением 3D-печати 206

<i>Н.М. Семенихина, Д.В. Минаков, А.А. Минакова, Д.А. Филиппенко</i>	<i>Е.В. Скворцова, И.Б. Назаров, Н.Д. Аксенов, А.Н. Томилин, С.А. Синенко</i>
Оценка цитотоксичности пленочных раневых покрытий на основе хитин-хитозановых комплексов из биомассы высших грибов 207	Активность дыхательного комплекса I митохондрии необходима для репрограммирования клеток в плюрипотентное состояние: функции митохондриальных АФК при репрограммировании 212
<i>А.С. Семкина, Ю.Д. Загоскин, С.Н. Чвалун</i>	<i>М.Н. Скрябина, С.С. Джауари, А.Л. Примак, Н.А. Басалова, М.А. Кулебякина, В.С. Попов, А.Ю. Ефименко, А.Я. Величко, В.А. Ткачук, М.Н. Карагаур</i>
Фазовые переходы тройных блок-сополимеров ПЛА-ПЭГ-ПЛА в водной среде 208	Генная инженерия мезенхимных стволовых клеток (МСК) с целью улучшения нейропротективных свойств их секретомы 213
<i>О.О. Сербина, Е.В. Киселева, Е.С. Васецкий</i>	<i>Е.Г. Скурихин, М.А. Жукова, А.М. Дыгай</i>
Мультipotентные стромальные клетки (МСК) тормозят дифференцировку миобластов при моделировании ЛЛПМД <i>in vitro</i> 208	Перспективы использования репрограммированных CD8 ⁺ Т-лимфоцитов в лечении мелкоклеточного рака легкого 213
<i>В.Г. Сергеев, К.С. Сергеева, М.С. Аникаева</i>	<i>Е.А. Сладкова, С.В. Заболотная, Т.А. Михайлик</i>
Дозазависимые различия лпс-индуцированного нейрогенеза и десквамации обонятельного эпителия мышей 209	Особенности плазмалеммы лимфоцитов при митогенной стимуляции 214
<i>М.С. Сердобинцев, Т.И. Виноградова, А.В. Баранов, А.И. Лаврова, М.Е. Дьякова, Д.С. Эсмедляева, Н.М. Блюм, М.З. Догонадзе, А.С. Кафтырев, Н.В. Заболотных, И.А. Баулин, П.К. Яблонский</i>	<i>В.Н. Слаутин, Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова, К.В. Коньшев</i>
Перспективы хирургического лечения туберкулезного остита с использованием электретов на основе тантала 209	Влияние трансплантации ММСК и фукоксантина на фиброз печени 214
<i>Е.В. Сидорский, М.С. Краснов, В.П. Ямскова, В.И. Лозинский</i>	<i>Я.С. Слесаренко, И.А. Яковлев, Р.В. Деев, А.А. Исаев</i>
Протекторное действие на ткани заднего отдела глаза <i>in vitro</i> при использовании ЗД-носителя, содержащего биорегулятор, выделенный из склеры глаза 210	Оценка эффективности плазмидных конструкций для разработки генной терапии пояснично-конечностных мышечных дистрофий R1 и R9 215
<i>Д.Н. Силачев, Е.А. Туровский, В.В. Головичева, Е.Г. Варламова, Т.И. Данилина, К.В. Горюнов, Ю.А. Шевцова, И.Б. Певзнер, Л.Д. Зорова, В.А. Бабенко, Е.А. Евтушенко, А.А. Жарикова, А.А. Хуторненко, С.И. Ковальчук, Е.Ю. Плотников, Д.Б. Зоров, Г.Т. Сухих</i>	<i>И.В. Смирнов, П.В. Смирнова, А.Ю. Тетерина, В.И. Калита, В.С. Комлев</i>
Внеклеточные везикулы, полученные из мезенхимальных стромальных клеток, обеспечивают нейропротекцию путем модуляции пути PI3K/АКТ и кальциевой осцилляции 210	Формирование биоактивных керамических покрытий на титановых имплантатах 216
<i>Д.В. Силин, Г.А. Власова, Е.В. Скорб, С.А. Уласевич</i>	<i>А.С. Смирнова, М.А. Кулебякина, Р.Ю. Еремичев, Н.А. Александрович, П.И. Макаревич</i>
Изучение влияния полиэлектролитных пленок с добавлением олигопептидов и гликопротеинов на пролиферацию клеток ... 211	Влияние активности ферментов семейства tet на экспрессию генов HOXA10 и HOXA11 в стромальных клетках эндометрия человека 216
<i>М.Ю. Сироткина, А.К. Зенкова, С.В. Шабельников, А.В. Нащекин, Ю.А. Нащекина</i>	<i>П.В. Смирнова, И.В. Смирнов, А.Ю. Тетерина, В.В. Минайчев, И.С. Фадеева, В.С. Комлев</i>
Исследование биосовместимости матриц на основе гибридных фибрилл коллагенов I и V типа 211	Разработка минерал-полимерных материалов, предназначенных для восстановления и регенерации утраченных костных тканей 217
<i>Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, В.В. Ильницкий, В.И. Севастьянов</i>	<i>А.О. Соловьева, А.М. Манахов</i>
Разработка бесферментных методов выделения островковой ткани из поджелудочной железы 212	Модификация поверхности синтетических нановолокон аминовым плазменным покрытием, повышающих эндотелизацию сосудистых стентов 217

- В.В. Соловьева, Т.В. Пухальская, Д.С. Чулпанова, А.А. Ризванов*
Мембранные везикулы мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией TRAIL индуцируют апоптоз в опухолевых клетках у ксенографтной модели мышей с аденокарциномой молочной железы 218
- Д.А. Сорогина, Е.С. Дроздова, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, А.А. Малахова, С.П. Медведев, С.М. Закиян*
Мутация в гене *GLUD2* приводит к снижению количества активных митохондрий в нейтральных производных ИПСК пациента с болезнью Паркинсона 218
- А.Г. Сорокина, Я.А. Орлова, О.А. Григорьева, Е.С. Новоселецкая, Н.А. Басалова, Н.А. Александровская, М.А. Виговский, К.И. Кириллова, А.В. Балацкий, Л.М. Самоходская, Н.В. Данилова, У.Д. Дьячкова, В.В. Какоткин, Д.А. Асратян, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко*
Изучение взаимосвязей между биомаркерами накопления сенесцентных клеток на системном, тканевом и клеточном уровнях при старении 219
- Е.М. Сперанская*
Фибробласты, тучные клетки, макрофаги десны у больных пародонтитом после лазерной терапии 219
- О.А. Спирин, А.Г. Аганесов, М.М. Алексанян, А.Е. Крупнин, С.А. Макаров*
Биосовместимое биодеградируемое межтеловое шейное устройство для стабилизации шейных позвонков 220
- В.В. Ставчанский, В.В. Южаков, Л.Е. Севаньякава, Н.К. Фомина, А.Е. Корецкая, А.Е. Денисова, И.Б. Филиппенков, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова*
Пептиды АКТГ(4-7)PGP (семакс) и АКТГ(6-9)PGP способствуют увеличению пролиферативной активности нейроглии в перинфарктных зонах мозга в условиях экспериментальной ишемии 220
- Ю.С. Стафеев, С.С. Мичурина, М.Ю. Агарёва, Е.С. Зубкова, И.А. Скляник, Е.А. Шестакова, А.О. Гаврилова, М.С. Синеокая, Е.И. Ратнер, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфенова, М.В. Шестакова*
Дистантное воздействие прогениторных и зрелых клеток большого сальника пациентов с сахарным диабетом 2 типа на здоровые клетки подкожной жировой ткани 221
- О.В. Степанова, А.Д. Воронова, А.В. Чадин, Г.А. Фурса, Е.К. Карсунцева, М.П. Валихов, А.С. Семкина, И.В. Решетов, В.П. Чехонин*
Эффективность применения нейротрофина-3 при совместной трансплантации с клетками обонятельной выстилки в посттравматические кисты спинного мозга 222
- Д.А. Степанова, В.И. Чечехин, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин*
Вклад паракринных факторов в развитие гетерологической сенситизации Мультипотентных мезенхимных стромальных клеток 222
- М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко*
Влияние на свойства НК-клеток оверэкспрессии каталитической субъединицы теломеразы и перспективы двойной модификации НК-клеток совместно с таргетным трансгеном 223
- А.М. Суббот, Н.В. Фисенко, Г.А. Осипян*
Анализ цитотоксичности гипотензивных лекарственных препаратов на первичной клеточной культуре эндотелия роговицы человека 223
- К.Н. Султанова, И.С. Неофитов, А.А. Титова, Р.В. Урсан, А.С. Плюшкина, М.С. Калигин, А.П. Киясов*
Выявление инсулина и глюкагона в процессе эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы у углистых мышей (*Acomys*) 224
- И.В. Супрун, Г.П. Чупрынин, А.А. Фоменко, Е.А. Солоп, А.С. Асякина, А.А. Веревкин, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова, К.И. Мелконян*
Морфологическая оценка отдаленных результатов использования ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики ... 224
- М.А. Суровцева, И.И. Ким, Н.А. Бондаренко, А.П. Лыков, К.Ю. Краснер, Е.В. Чепелева, А.Н. Трунов, В.В. Черных, О.В. Повещенко*
Сравнение фенотипа и функциональной активности фибробластов роговицы и фибробластов, дифференцированных в кератоциты 225
- Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева, М.А. Соборов, С.В. Гарманов, В.А. Мироненко, Р.А. Серов*
С-kit-позитивные стволовые клетки в интима аорты с аневризмой 225
- Т.В. Сухачева, Р.А. Серов, М.Н. Шамаракова, Н.В. Низяева*
Телоциты и фибробластоподобные клетки миометрия при преэклампсии 226
- В.Ю. Сыромятникова, И.И. Салафутдинов, М.О. Гомзикова*
Оценка проангиогенного потенциала плазмидной ДНК, ко-экспрессирующей гены *FGF2* и *VEGF165*, на индукцию локального ангиогенеза *in vivo* 226
- Е.В. Сытина, Т.Х. Тенчурин, Е.В. Соловьева, А.А. Алексеев, С.Н. Чвалун, А.А. Пантелеев*
Кальцификация коллагеновых нетканых материалов при подкожной имплантации 227

<i>Р.Б. Тагаева, Н.М. Юдинцева, Д.Е. Бобков, Д.Ф. Гончарова, А.С. Нечаева, Е.В. Федоров, М.А. Шевцов</i>	<i>Т.В. Толстова, М.Г. Дроздова, Т.Н. Попырина, Т.С. Демина, Т.А. Аколова, Е.А. Марквичева</i>
Анализ подвижности mHSP70-положительных клеток мультиформной глиобластомы в модели эксплантата 227	Матрицы на основе сополимеров хитозана с олиголактоидами: получение и изучение в модели <i>in vitro</i> 232
<i>С.С. Таргачев, Д.А. Трофимов, Г.Г. Кундакчян, А.М. Агаев, Л.А. Новичёнок, Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, В.А. Маркосян, З.З. Сафиуллов</i>	<i>А.Е. Толстолужинская, Н.А. Басалова, Е.С. Новоселецкая, М.Н. Карагяур, Р.Ю. Еремичев, А.Ю. Ефименко</i>
Аутологичный обогащенный генетическим материалом лейкоконцентрат для превентивной генной терапии ишемического инсульта в модели на мини-свиньях 228	Реконструкция структуры фибротического фокуса как модели для оценки прогрессирования фиброза <i>in vitro</i> 233
<i>Т.Х. Тенчуринов, Д.М. Седов, Р.В. Шариков, Л.И. Давыдова, К.В. Сидорук, Е.В. Соловьева, В.Г. Богуш, Т.Е. Григорьев</i>	<i>А.И. Трофименко, А.Х. Каде</i>
Получение гибридных матриц на основе природных и синтетических полимеров 228	D-аспарагин улучшает приживление биополимерного скаффолда кожи после ранней некрэктомии 233
<i>Т.Х. Тенчуринов, И.Я. Бозо, С.В. Крашенинников</i>	<i>Е.А. Трусова, М.С. Холина, Д.С. Святославов, С.И. Самойлова, И.В. Решетов, К.В. Шайтан, А.П. Бонарцев</i>
Сравнительная оценка механических характеристик коммерческих мембран для стоматологии 229	Поли-3-оксибутират как инструмент имитации микроокружения опухоли 234
<i>А.Ю. Тетерина, И.В. Смирнов, П.В. Смирнова, И.С. Фадеева, В.В. Минайчев, С.М. Баринков, В.С. Комлев</i>	<i>Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, П.А. Вишнякова, Д.К. Матвеева, Г.Е. Онищенко, Е.А. Смирнова</i>
Влияние структурных и фазовых трансформаций низкотемпературных кальцийфосфатных соединений в моделях имплантации SPF-животным с нормальным и измененным иммунным статусом <i>in vivo</i> 229	Влияние растительных гормонов на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов человека 234
<i>А.В. Тимофеева, Э.Р. Ахметзянова</i>	<i>Е.А. Тырина, Л.Б. Буравкова</i>
Изменение фенотипа и морфологии клеток микроглии при травме спинного мозга различной степени тяжести 230	Длительное сокультивирование гемопоэтических клеток пуповинной крови и мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях моделирования эффектов микрогравитации 235
<i>Н.Б. Тихонова, А.А. Темнов, В.В. Алексанкина, А.П. Милованов, Т.В. Фокина, А.Н. Склифас</i>	<i>П.А. Тюрин-Кузьмин, В.И. Чечехин, К.Ю. Кулебякин, В.С. Попов, Н.И. Калинина, В.А. Ткачук</i>
Васкуляризация зоны заживления стенки матки крысы под действием препарата на основе кондиционированной среды культивирования аутологичных мезенхимальных клеток в гипоксических условиях 230	Гормональная регуляция инициации дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток 235
<i>Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян</i>	<i>В.А. Уметбаева, О.И. Желтова, И.В. Меледина</i>
Альтернативный способ «перепрограммирования» лимфоцитов 231	Особенности иммунологических изменений в инкубационном периоде новой коронавирусной инфекции (НКВИ) 236
<i>Д.В. Товпеко, А.А. Кондратенко, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов</i>	<i>В.С. Усатова, М.А. Берестовой, Н.М. Мишина, А.В. Иваненко, Д. Джэппи, А.В. Розов, В.В. Белоусов</i>
Изготовление бесклеточного продукта из высокорегенеративного материала пуповины человека для лечения глубоких ран ... 231	Создание и применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, стабильно экспрессирующих генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры 237
<i>Л.Н. Токтохоева, Е.С. Дёмина, Н.П. Рабданова, Р.Ю. Абашеев, А.С. Долодоев, А.П. Цыбденова, Ю.С. Балханов, А.А. Нимаева, М.Ф. Серых</i>	<i>В.А. Усачёв, М.В. Воронцова, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин- Кузьмин, И.В. Зубарев</i>
Получение и применение лизата тромбоцитов для культивирования мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика человека .. 232	Переключение экспрессии аденилатциклаз и фосфолипаз в процессе дифференцировки клеток 237

<i>Д.Ю. Усупжанова, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, В.А. Никитина, Т.Ф. Маливанова, Е.Е. Ломоносова, А.А. Самойлов</i>	
Влияние малых доз ионизирующего излучения на иммунологический и секреторный профиль мезенхимальных стромальных клеток человека	238
<i>Е.Г. Уфимцева, Н.И. Еремеева</i>	
Мезенхимные стволовые/стромальные клетки в различных очагах инфекции из легких пациентов, больных туберкулезом	238
<i>Ф.А. Фадеев, А.Д. Никанорова</i>	
Влияние способа стимуляции созревания на секрецию культивируемыми <i>in vitro</i> дендритными клетками IL-12	239
<i>А.Н. Файзулина, А.Д. Кручинина</i>	
Исследование биосовместимости децеллюляризованных коллагеновых скаффолдов с антимикробной активностью ...	239
<i>А.Л. Файзуллин, А.А. Земеров, А.С. Балкинский, А.А. Бакулина, Е.И. Иванова, П.С. Тимашев</i>	
Применение нейронных сетей для морфологического анализа периимплантных тканей	240
<i>В.С. Федоров, Н.М. Юдинцева, Р.Б. Тагаева, М.А. Шевцов</i>	
Применение суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, функционализированных мишенными лигандами, для диагностики инфекционных и онкологических заболеваний	240
<i>А.П. Федоровский, М.Н. Карагяур, К.Ю. Кулебякин</i>	
Разработка репортерной клеточной линии для изучения инсулиновой сигнализации в реальном времени	241
<i>А.Ю. Федотов, О.В. Баранов, В.С. Комлев, С.А. Мирахмедова, И.А. Золотухин</i>	
Микрофлюидное устройство для изучения воспаления и ремоделирования эндотелия <i>in vitro</i>	241
<i>В.Э. Фетисова, А.Ю. Тетерина, В.С. Комлев</i>	
Разработка тканевых эквивалентов на основе биополимеров для лечения диабетических и трофических поражений кожных покровов	242
<i>И.Ю. Филин, К.В. Китаева, А.В. Городилова, Ю.П. Маясин, Ч.Б. Харисова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов</i>	
Иммуномодулирующая активность индуцированных мембранных везикул опухолевых клеток со сверхэкспрессией интерлейкина-2 <i>in vitro</i>	242
<i>И.Б. Филиппенков, Ю.А. Ремизова, И.В. Мозговой, К.Д. Головина, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, Л.В. Губский, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова</i>	
Транскриптомные сигналы биполушарных изменений в мозге крыс после обратимой церебральной ишемии	243
<i>Ю.С. Фомина, Ю.Д. Загоскин, С.Н. Чвалун, Т.Е. Григорьев</i>	
Гидрогели на основе тройных блок-сополимеров P(D,L)LA-PEG-P(D,L)LA как перспективные материалы биомедицинского назначения	243
<i>Г.А. Фурса, С.С. Андрецова, О.В. Степанова, А.В. Чадин, А.Д. Воронова, Е.К. Карсунцева, А.С. Семкина, А.О. Сосновцева, И.В. Решетов, В.П. Чехонин</i>	
Применение нейротрофического фактора мозга для улучшения подвижности задних конечностей крыс при травмах спинного мозга	244
<i>Р.Р. Хадиуллина, Д.Р. Давлетшин, Э.М. Хусаинова, Р.М. Миргаязова, В.В. Часов, М. Бауд, Э.Р. Булатов</i>	
Реактивация мутантного онкосупрессора P53 производными аминобензотиазола	245
<i>А.В. Халявкин</i>	
Физиологическая регенерация «необновляемых» клеточных зон	245
<i>М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Т.В. Глушкова, Л.В. Антонова</i>	
Эндотелизация сосудистого протеза в условиях пульсирующего потока	245
<i>Ю.П. Харская, Е.В. Зубарева, Н.С. Босенко, С.В. Надеждин, К.С. Бояршин</i>	
Культивирование мезенхимных стволовых клеток крысы на матрицах в условиях действия постоянного магнитного поля умеренной интенсивности	246
<i>М.В. Харченко, Р.С. Каменцева, Е.С. Корнилова</i>	
Влияние лигандов рецептора ЭФР на пролиферацию и дифференцировку эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека	247
<i>И.А. Хворова, Е.А. Репкин, Д.А. Переплетчикова, Д.А. Костина, А.Б. Малашичева, А.А. Лобов</i>	
Активация сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках приводит к изменению репертуара гистонов 1	247
<i>М.А. Хворостина, Т.Б. Бухарова, В.К. Попов</i>	
Особенности кинетики трансфекции эукариотических клеток плазмидными конструкциями в составе гидрогелевых матриксос	248
<i>С.А. Хмелевская</i>	
Философские основания правового регулирования отношений, связанных с технологией «искусственной матки» (AWT)	248

<i>Н.В. Храмова, О.С. Чарышникова, Н.А. Циферова, Х. Алимова, Х.Х. Умурзакова</i> Разработка тканеинженерной конструкции из шелковой отваренной марли и аллофибробластов для лечения поверхностных дефектов кожи	249	<i>Э.С. Чермных, Е.П. Калабушева, Е.В. Алпеева, С.П. Домогатский, Е.О. Осидак, Е.А. Воротеляк</i> Анализ активации ключевых сигнальных каскадов, регулирующих морфогенетический потенциал дермальных клеток в коллагеновом геле	254
<i>Е.А. Храмова, О.Р. Куликова, Т.Е. Григорьев</i> Ультразвуковая микроскопия высокого разрешения — неразрушающий метод оценки морфологии и механических свойств тканеинженерных конструкций	249	<i>М.В. Черноруцкий, М.Б. Белякова, Н.В. Костюк, О.В. Волкова, М.Н. Калинин</i> Стимуляция адипогенеза аутологичными сыворотками в культуре эксплантов жировой ткани кроликов с экспериментальной гиперлипидемией	254
<i>А.С. Цыбко, Д.В. Ерёмин, Н.В. Хоцкин, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко</i> Рекомбинантный белок CDNF как потенциальное средство коррекции поведенческих нарушений при нейродегенеративных заболеваниях	250	<i>Д.П. Чернюк, М.И. Полозова, Е.И. Пчицкая, Г. Балтынк, И.Б. Безпрозванный</i> Гиперэкспрессия Vcl-2K17D при помощи AAV-вектора снижает число амилоидных бляшек в мозге 5FAD мышей с болезнью Альцгеймера	255
<i>А.С. Чабина, А.В. Лихачев, А.В. Нащекин, Д.А. Курдюков, Н.Д. Просалов, Ю.А. Нащекина</i> Культирование клеток на поликапролактоновых матрицах, модифицированных аминокетонами	250	<i>С.А. Четкина, А.М. Юнусова, И.Е. Пристяжнюк, Т.А. Шнайдер</i> Изучение морфологических изменений церебральных органоидов человека при оверэкспрессии белка Contactin 6	255
<i>А.А. Чагаров</i> Свойства наноструктурированных покрытий на основе диоксида титана, нанесенных методом ALD	251	<i>В.И. Чечехин, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин</i> Молекулярные механизмы развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением	256
<i>А.С. Чвилёва, А.М. Юнусова, И.Е. Пристяжнюк, А.С. Рыжкова, А.В. Смирнов, П.С. Белокопытова, Т.А. Шнайдер</i> Исследование эффекта делеций зон ускоренного развития человека в локусе CNTN6 в ранних этапах нейрогенеза	251	<i>М.Е. Чигряй, А.В. Раковская, Д.П. Чернюк, А.Б. Гордеев, Е.И. Пчицкая, Г. Балтынк, И.Б. Безпрозванный</i> Антиапоптотический белок BCL- 2 взаимодействует с рецептором IP3R и восстанавливает число синаптических контактов в гиппокампе 5FAD мышей с болезнью Альцгеймера	256
<i>С.В. Чеботарев, Л.И. Калюжная, А.Л. Кудяшев</i> Доклиническое исследование эффективности тканеинженерного гидрогеля из пуповины человека в восстановлении внутрисуставного дефекта хряща	252	<i>И.В. Чистякова, Н.И. Бакаленко, М.А. Атюков, А.Б. Малашичева</i> Изучение Notch — опосредованной дифференцировки лёгочных резидентных фибробластов человека	257
<i>И.А. Чекмарева, Х.А. Абдувосидов, О.В. Паклина</i> Структурно-функциональные изменения телоцитов в зоне венозных трофических язв нижних конечностей	252	<i>Д.С. Чулпанова, Т.В. Пухальская, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева</i> Иммунотензирующие и противоопухолевые свойства мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток человека со сверхэкспрессией интерлейкина 2	257
<i>И.А. Чекмарева, О.В. Паклина</i> Телоциты (интерстициальные кахалеподобные клетки) в регенерации кожных ран	253	<i>Г.П. Чупрынин, И.В. Супрун, Е.А. Солоп, А.А. Фоменко, А.А. Веревкин, М.Л. Муханов</i> Иммунотензирующие особенности регенерации костной ткани с использованием костного ауторегенерата	258
<i>И.А. Чекмарева, А.В. Ревизин, Г.В. Павлова, С.В. Сдобникова</i> Особенности ангиогенеза при диабетической ретинопатии	253		
<i>Е.В. Чепелева, М.Б. Васильева, Е.В. Кузнецова, Д.С. Сергеевичев</i> Оптимизация протокола децеллюляризации соединительнотканых матриц ксеногенного происхождения для лечения сердечно-сосудистых заболеваний	254		

<i>А.А. Шаймарданова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева, Ш.С. Исса, А.И. Муллагулова, А.А. Титова, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.В. Тимофеева, А.М. Аймалетдинов, И.Р. Нигметзянов, А.А. Ризванов</i>	<i>И.Н. Шипунова, А.И. Дорофеева, Т.Ф. Савватеева, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова</i>
Кросс-коррекция дефицита β -гексозаминидазы а в мутантных клетках пациента с болезнью Тея-Сакса с использованием генетически модифицированных стволовых клеток	Гетерогенность экспрессии гена NES в мезенхимных клетках-предшественницах из костного мозга человека
258	263
<i>А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, В.В. Соловьева, Я.О. Мухамедшина, А.А. Костенников, А.А. Ризванов</i>	<i>А.И. Шорников, Л.М. Меркулова</i>
Анализ эффективности генной терапии на основе аденоассоциированных вирусов после формирования векторного иммунитета .	Плацентарные макрофаги и тучные клетки в условиях эндогенного дисбаланса биогенных аминов при преэклампсии
259	263
<i>Е.Ю. Шаповалова, Ю.Г. Барановский, С.В. Харченко, И.А. Лугин, А.Г. Барановский</i>	<i>М.А. Шорохова, Ю.С. Иванова, Л.Л. Алексеенко, И.В. Кожухарова, Н.А. Пуговкина, А.П. Домнина, И.К. Кунеев, Т.М. Гринчук, О.Г. Люблинская</i>
Макрофаги как компонент регенеративного гистиона на фоне закрытия ишемизированного кожного дефекта тканеинженерным конструктом из коллагена и дермальных фибробластов	Частичное репрограммирование как способ ревитализации мезенхимных стволовых стромальных клеток человека
259	264
<i>Г.Р. Шаропова, Н.В. Калачева, Г.М. Фазлеева, Л.Н. Исламова</i>	<i>Я.Ю. Шпетко, И.Б. Филиппенков, Ю.А. Ремизова, К.Д. Головина, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, Л.В. Губский, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова</i>
Митохондриально-адресованный антиоксидант полиолметанофуллерен снижает выживаемость клеток глиобластомы <i>in vitro</i> ...	Влияние продолжительности наркоза с применением изофлурана на транскриптом клеток мозга крыс в условиях церебральной ишемии
260	265
<i>Р.В. Шариков, Д.Р. Стрельцов, С.Н. Малахов, Т.Х. Тенчурин, Л.И. Давыдова, В.Г. Богущ, С.Н. Чвалун</i>	<i>А.В. Шулепов, И.В. Шеладев, И.А. Одинцова, О.Е. Миргородская, М.И. Шперлинг, Ю.В. Юркевич, П.А. Романов</i>
Структура и свойства волоконистых материалов на основе рекомбинантных спидроинов для биомедицины	Динамика репаративных процессов при компрессионной травме скелетных мышц
260	265
<i>Н.А. Шарикова, К.И. Луканина, С.Н. Малахов, С.В. Крашенинников, П.М. Готовцев, Т.Е. Григорьев</i>	<i>И.А. Шурыгина, И.С. Трухан, Н.Н. Дремина, М.Г. Шурыгин</i>
Полимерные материалы для электростимуляции клеточного роста	Влияние фактора роста фибробластов на интенсивность апоптоза в культуре перитонеальных фибробластов
261	266
<i>О.Н. Шевелева, Е.А. Протасова, Т.А. Ненашева, Н.Н. Буторина, С.П. Медведев, Е.В. Григорьева, В.И. Мельникова, И.В. Лядова</i>	<i>И.А. Шурыгина, О.А. Гольдберг, А.П. Животенко, В.А. Сороковиков</i>
Получение и характеристика макрофагов человека с индуцибельной экспрессией гена TNFAIP3	Репаративные процессы в зоне ламинэктомии в эксперименте
262	266
<i>А.И. Шевченко, С.М. Закиян</i>	<i>И.А. Шурыгина, И.С. Трухан, Н.Н. Дремина, М.Г. Шурыгин</i>
Роль конститутивного гетерохроматина в инактивации X-хромосомы	Динамика экспрессии кавеолина в эпидермисе при регенеративных процессах
262	267
<i>Д.М. Шимченко, Т.П. Герасимова, И.А. Гривенников, С.А. Антонов, Л.В. Новосадова, Е.Л. Арсеньева, В.З. Тарантул, Е.В. Новосадова</i>	<i>А.Д. Юдаева, С.С. Мичурина, Ю.С. Стафеев, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова</i>
Получение глиальной популяции клеток из индуцированных плюрипотентных клеток пациентов с моногенными формами болезни Паркинсона	Регуляция экспрессии генов адипоцитов ЗТЗ-L1 с помощью системы CRISPRa/i
262	267
<i>Н.М. Юдинцева, М.Г. Хотин, М.А. Шевцов, М.И. Сулацкий, Д.Ф. Гончарова, Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, А.Н. Ремезова, М.З. Догонадзе, Н.В. Заболотных, М.Е. Дьякова, Д.С. Эсмедляева, И.А. Гарапач, О.С. Маслак, Н.А. Михайлова</i>	<i>И.А. Шурыгина, И.С. Трухан, Н.Н. Дремина, М.Г. Шурыгин</i>
Применение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, в терапии нефротуберкулеза	Динамика экспрессии генов адипоцитов ЗТЗ-L1 с помощью системы CRISPRa/i
268	267

<i>В.В. Юницкая, Т.А. Мараховская, О.И. Боровикова, И.Б. Васина, Н.Э. Скобликов</i>	<i>И.В. Яминский</i>
Оценка внеклеточной ДНК как маркера анеуплоидий плацентарных клеточных линий ...	Сканирующая зондовая микроскопия в решении задач регенеративной медицины ...
268	271
<i>Г.М. Юсубалиева, С.В. Кулемзин, А.А. Калинин, П.А. Мельников, М.В. Ширманова, В.В. Белоусов, В.П. Баклаушев</i>	<i>Н.К. Ярыгина, В.В. Бурунова, А.М. Гисина, К.К. Сухинич, З.Н. Макиян</i>
Клеточная иммунотерапия солидных опухолей ..	Нарушение клеточной дифференцировки при аплазии матки и поиск путей их коррекции методами регенеративной медицины
269	271
<i>Б.Г. Юшков</i>	<i>Е.В. Ястремский, Т.Д. Пацаев, А.М. Азиева, Д.А. Кириллова, А.А. Михуткин, К.Г. Антипова, Р.В. Шариков, Н.А. Шарикова, К.И. Луканина, Т.Е. Григорьев, Р.А. Камышинский, А.Л. Васильев</i>
Нарушения взаимодействия клеток- предшественниц и их микроокружения как основа патологии	In situ деформационные исследования полимерных матриц различных типов в РЭМ
270	272
<i>И.А. Яковлев, А.М. Емелин, И.С. Лимаев, О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, В.О. Солдатов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, А.А. Ризванов, Р.В. Деев, А.А. Исаев</i>	<i>Е.М. Яценко, Д.С. Барановский, Н.С. Семенова</i>
Двухвекторная система на основе аденоассоциированного вируса для генной терапии дисферлинопатии	Влияние концентрации кондиционной среды мезенхимальных стромальных клеток на мононуклеары крови
270	272

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:

1 19333 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 statistical 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:

nor 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